

ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТОРІВ БАКТЕРІАЛЬНОГО FtsZ БІЛКУ, СПРЯМОВАНИХ НА ВЗАЄМОДІЮ ІЗ САЙТАМИ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ПОХІДНИХ КУМАРИНОВОГО РЯДУ

П.А. КАРПОВ *, Д.С. ОЖЕРЕДОВ, С.П. ОЖЕРЕДОВ, О.М. ДЕМЧУК, С.І. СПІВАК, Я.Б. БЛЮМ

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», вул. Байди-Вишневецького, 2а, Київ, 04123, Україна

E-mail: karpov@nas.gov.ua; karpov@ifbg.org.ua

Автор-кореспондент, karpov@nas.gov.ua; karpov@ifbg.org.ua

Існують численні інгібітори бактеріального FtsZ білка, біологічна активність яких доведена біохімічно, проте цільові сайти ліганд-білкової взаємодії для більшості з них залишаються невідомими. Це ускладнює подальший комбінаторний дизайн і у актуальному дослідженні нами представлено результати пошуку ефекторів сайтів зв'язування 4-гідроксікумарину (BP1 і BP2). Представлені дані ґрунтуються на результатах фармакофорного скринінгу, хемоінформаційної класифікації, молекулярному докінгу, симуляціях молекулярної динаміки, методах штучного інтелекту, тощо. Цільовою групою була об'єднана бібліотека з 379 речовин, яка сформована за результатами ревізії структурної бази даних RCSB Protein Data Bank і речовин з бази даних ChEMBL, для яких біохімічно доведена взаємодія з FtsZ. За результатами комплексного дослідження відібрано 39 сполук, з яких 28 ідентифіковані як ефектори сайтів BP1 і BP2, а ще 11 як специфічні ефектори сайту BP2, розташованого у суперкишені BP2/IDC.

Ключові слова: FtsZ, BP1, BP2, кумарини, ліганд-білкова взаємодія, хемоінформатика, фармакофорний пошук, молекулярний докінг, штучний інтелект.

Вступ. Дія антибіотиків обумовлена їх хімічним втручанням в процеси синтезу або функціонування життєво важливих структур бактеріальної клітини (Pham, 2018). Молекулярні мішені існуючих препаратів переважно пов'язані з процесами біосинтезу білків, формування клітинної стінки, синтезу нуклеїнових кислот або функціонування мембран бактеріальної клітини (Monserat-Martinez et al., 2019). Проте, у зв'язку із зростанням резистентності бактерій до існуючих антибактеріальних агентів, ключовою задачею є пошук нових стратегій і молекулярних мішеней ліганд-індукованого впливу (Crunkhorn et al., 2025). Однією з важливих

антибактеріальних мішеней є філаментподібний термочутливий білок Z (FtsZ), який водночас є найближчим бактеріальним гомологом тубуліну ссавців (Scheffers and Driessen, 2001; Faguy and Doolittle, 1998; Rayevsky et al., 2022). Структурні порушення і ліганд-індуковане інгібування FtsZ призводять до уповільнення, помилок або зупинки поділу бактерій та їх загибелі (Suresh et al., 2023). Незважаючи на перспективність інгібіторів FtsZ в залежності від сайту ліганд-білкової взаємодії зазначена молекулярна мішень має певні недоліки. Більшість з них пов'язана із структурною подібністю молекул FtsZ і ізотипів тубуліну (Dyer, 2009). Перш за все, це стосується ефекторів сайту гідролізу ГТФ (NBS – Nucleotide Binding Site), який у структурному і функціональному відношенні зберігає значну подібність молекул FtsZ та тубуліну. Таким чином, незважаючи на прикладі ефективного інгібування FtsZ ГТФ-конкурентними інгібіторами, їх впровадження обмежено високим рівнем токсичності для пацієнтів (Scheffers D, Driessen, 2001; Andreu et al., 2022). Зазначена проблема може бути вирішена через застосування агентів, спрямованих на альтернативні сайти, які на відміну від сайту NBS проявляють більшу відмінність цільових кишень.

Прикладом більш специфічного інгібування є алостеричні інгібітори FtsZ, які діють через сайт інтердоменної щілини (IDC, Inter-Domain Cleft) (Pradhan et al., 2021). Так, із сайтом IDC пов'язана дія сполук бензамідної групи, які раніше були ідентифіковані при проведенні скринінгу панелі сполук на культурах бактерій *in vitro*. Канонічним прикладом є 2,6-дифторбензамід PC190723: 3-[(6-chloro[1,3]thiazolo[5,4-b]pyridin-2-yl)methoxy]-2,6-difluorobenzamide (Andreu et al., 2010),

ефективність якого була доведена на штаммах *Staphylococcus aureus* та *Bacillus subtilis* (Matsui et al., 2012; Gurnani et al., 2022). Також, PC190723 виявив здатність пригнічувати метицилін-резистентні штами *S. aureus* MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*) (Tan et al., 2012). Згодом дані кристалографії довели, що саме альтернативний механізм взаємодії обумовлює ефективність і меншу токсичність 2,6-дифторбензамідів (Sharma et al., 2023).

Таким чином, ключовий потенціал FtsZ, як перспективної молекулярної мішені, пов'язаний саме із сполуками, спрямованими на сайти, які є альтернативними NBS (Rayevsky et al., 2022; Karpov et al., 2024). Нажаль, незважаючи на значне зростання кількості депонувань ліганд-білкових комплексів в RCSB Protein Data Bank, дані стосовно сайтів і механізмів ліганд-індукованого впливу представлені для FtsZ значно поступаються тубулінам (Berman et al., 2003). Проте, звертаючи увагу на подібність структурної організації FtsZ і тубулінів, можна розраховувати на існування ще невідомих сайтів і агентів ліганд-індукованого впливу на молекули FtsZ.

Нещодавно слідом за сайтом IDC були отримані кристалографічні докази (PDB: 6Y1V і 6Y1U) існування двох сайтів зв'язування молекул 4-гідроксикумарину (4HC = 4-Hydroxy-2H-chromen-2-one = 4-hydroxychromen-2-one = 4-HYDROXYCOUMARIN = 4-hydroxychromen-2-one). Було продемонстровано, що зв'язування 4HC з FtsZ викликає критичні алостеричні здвиги, але їх природа відрізняється від перебудов, що викликають 2,6-дифторбензаміді (Ozheredov and Karpov, 2024). Також було доведено, що 4HC зв'язується з кишнями BP1 і BP2 молекули FtsZ виключно у нуклеотид-вільному (GTP і GDP) стані. Вважається, що це пов'язано із особливостями процесу формування кишень цільових сайтів, а саме із гнучкістю спіралі H7, яка змінюється за конформацією і положенням в залежності від присутності молекули гуанозинфосфату (GTP або GDP) у сайті NBS. (Alnami et al., 2021; Ozheredov and Karpov, 2024)

Аналогічно до ефекторів сайту IDC, на початку 70-х років минулого сторіччя, ще до появи перших кристалографічних даних, 4-гідроксикумарин вже позиціонувався як перспек-

тивний антибіотик природного походження (Bye and King, 1970). За походженням, 4HC є грибним метаболітом, якій синтезується з кумарину, і знаходить застосування при ферментативному виробництві антикоагулянту дикумаролу (Liu et al., 2010). Також, 4HC було знайдено в екстрактах деяких рослин: *Ruta gra-veolens*, *Vitis vinifera*, *Apis cerana*, тощо [<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54682930#section=Chemical-Gene-Co-Occurrences-in-Patents>].

На відміну від сайту BP1, карман BP2 має топологічне перекриття із сайтом зв'язування таксолу β -тубуліном, що не лише підтверджує спільне еволюційне походження FtsZ і тубулінів, але й підтверджує гіпотезу гомології карманів сайтів ліганд-білкової взаємодії (Alnami et al., 2021).

Попередні дослідження показали, що на відміну від того, як зв'язування бензамідних сполук викликає значні зміщення у структурі С-термінального домену FtsZ і спіралі H7, зв'язування 4-гідроксикумарину викликає більш помітні деформації у ГТФ-азному домену (Ozheredov and Karpov, 2024; Ozheredov et al., 2024; Karpov et al., 2024). При цьому, ефектори обох сайтів реалізують унікальні алостеричні механізми, які переважно реалізуються через деформації та зміщення спіралі H7. Механізми алостеричних перебудов, індукованих зазначеними ефекторами, відрізняються, але у обох випадках, їх зв'язування з FtsZ обумовлюють виникнення порушень карману ГТФ, зміни у загальній геометрії молекул FtsZ, та, як наслідок, критичну деформацію інтерфейсів протофіламентів (Ozheredov and Karpov, 2024; Alnami et al., 2021). Прі цьому, зв'язування 4HC викликає утворення деформаційного злому спіралі H7 зі зміщенням її частини у напрямку кишні NBS, що саме і порушує посадку молекул GTP/GDP (Ozheredov and Karpov, 2024).

На сьогодні існує досить велика група інгібіторів FtsZ, біологічну активність яких доведено біохімічно, проте сайти зв'язування для більшості ефекторів залишаються невідомими. Актуальна ревізія бази даних ChEMBL (www.ebi.ac.uk/chembl/) виявила 379 ефекторів FtsZ, цільові сайти більшості з них, або невідомі, або існують на рівні прогнозу. На сьогодні в RCSB Protein Data Bank депоновано 85 струк-

тур комплексів FtsZ білків з 61 унікальним лігандом.

В межах актуального дослідження на підставі існуючих структурних даних нами було виконано відбір ефекторів сайтів зв'язування гідроксикумаринів. За результатами фармакофорного скринінгу, хемоінформаційної класифікації, молекулярного докінгу, молекулярної динаміки, а також із використанням методів штучного інтелекту, серед групи ефекторів FtsZ, представлених в ChEMBL, нами були відібрані ефектори сайтів зв'язування похідних кумарину. Це дозволить у подальшому використовувати отримані дані під час проведення комбінаторного дизайну і скринінгу нових інгібіторів бінарного поділу бактерій.

Матеріали і методи. Цільовою групою дослідження була бібліотека речовин, сформована за результатами ревізії структурної бази даних RCSB Protein Data Bank (Berman et al, 2003; Burley et al, 2025), а також, група біохімічно-доведених ефекторів FtsZ з бази даних ChEMBL (Zdratil et al, 2025). При цьому, контрольною групою виступали ліганди з RCSB, а також, похідні кумарину, для яких здатність пригнічувати полімеризацію FtsZ була підтверджена біохімічно: KI і IC₅₀ (Duggirala et al., 2014).

Бібліотеки лігандів було збережено у форматах *.mol2 і *.SD/*.sdf, що відповідає вимогам програм DataWarrior (Sander et al, 2015), CCDC GOLD (Jones et al, 1997) і iGEMDOCK (Yang and Chen, 2004). Використання зазначених бібліотек, також дозволило створити об'єднану бібліотеку для фармакофорного скринінгу, яка враховує конформаційну рухливість і ізомерію сполук. На момент дослідження ця бібліотека нараховувала 21270 конформомерів і була інтегрована у персональний кабінет мережевого інструменту Pharmit (IFBG: Public Library «PDB+ChEMBL», доступ за кодом: VBS30074UAMW00AL8EML) (Sunseri and Koes, 2016).

У якості молекулярних мішеней було використано структури FtsZ депоновані в RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org), 3D-моделі побудовані за допомогою сервісів Swiss-Modell — <https://swissmodel.expasy.org> (Waterhouse et al., 2018), а також повноатомні моделі побудовані із використанням штучного інтелекту. В останньому випадку було використано

алгоритм AlphaFold3 (Abramson et al, 2024), реалізований за допомогою за допомогою сервісу Protenix Server — <https://protenix-server.com/add-prediction> (ByteDance AML AI4Science Team, 2025). Оцінка якості та достовірності побудованих моделей комплексів враховувала такі показники, як pTM (predicted Template Modelling) та ipTM (interface predicted Template Modelling), які базуються на канонічному показнику TM (Template Modelling) (Xu and Zhang, 2010), показнику тесту прогнозування відмінностей локальних дистанцій pLDDT (predicted Local Distance Difference Test) (Mariani et al, 2013) та показнику достовірності (похибки) прогнозу PAE (Predicted Aligned Error) (Elfmann and Stülke, 2023).

Для візуалізації та аналізу молекулярних структур використовували пакет програмного забезпечення PyMOL v.2.5.5 (Schrödinger LLC, www.pymol.org) і BIOVIA Discovery Studio 2024 Client (<https://discover.3ds.com/>). Побудову 2D-карт ліганд-білкових взаємодій було виконано із використанням програмних інструментів програм BIOVIA Discovery Studio 2024 Client і cLigPlus (Laskowski et al., 2011).

Оптимізація та перевірка стабільності структур білків і побудованих ліганд-білкових комплексів виконувались за допомогою методів молекулярної динаміки в програмі Gromacs v. 2024.5 (Abraham et al., 2024) із використанням силового поля CHARMM36ff, моделі сольвенту Tip3 і температури 310 K. Фізіологічний стан систем відтворювали шляхом заміщення частини молекул води іонами Na⁺(NA) і Cl⁻(CL). Максимальний час симуляцій складав 210 ns.

Аналіз об'ємів і геометрії кишень сайтів здійснювали за допомогою технології Catalophore™, яка реалізована у плагіні Innophore CavitOmIX (версія 1.0, 2022, Innophore GmbH — <https://innophore.com/cavitomix>) програми PyMOL (Gruber et al., 2015; Hetmann et al., 2023; Parigger et al., 2024).

Гідрофобність порожнин розраховували із використанням інтегрованого модуля VASCO (Steinkellner et al, 2009), а об'єм сайтів визначався із використанням модифікованого алгоритму LIGSITE (Hendlich et al, 1997).

Фармакофорний пошук здійснювали за допомогою інтерактивного On-Line сервісу

Pharmit (<https://pharmit.csb.pitt.edu/>), який дозволяє здійснювати віртуальний скринінг великих бібліотек лігандів на підставі фармакофорних дескрипторів, молекулярних форм і мінімізації енергій (Sunseri and Koes, 2016).

Молекулярний докінг сполук, відібраних за результатами фармакофорного пошуку, здійснювали за допомогою програмного пакету CCDC GOLD 2023.2.0 (Build 382240; www.ccdc.cam.ac.uk, under Licence and Support Agreement of CCDC FAIRE programme grant ID: 21554) (Jones et al, 1997). При цьому, ранжування гіпотез здійснювали на підставі показників оцінювальних фітнес-функцій: ChemPLP (основана) і ASP (функція рескорингу).

Кількісну оцінку внеску водневих зв'язків, Ван-дер-Ваальсових сил та інших факторів формування ліганд-білкового комплексу здійснювали за результатами докінгу в програмі iGEMDOCKv 2.1 (Yang and Chen, 2004). На підставі оригінального методу (Generic Evolutionary Method for molecular DOCKing), iGEMDOCK, який дозволяє розрахувати кількісні фітнес-показники спорідненості сполук до сайту на підставі внеску водневих зв'язків (Hbond), сил Ван-дер-Ваальса (vdW) і електростатики (Elec): $\text{Fitness} = \text{vdW} + \text{Hbond} + \text{Elec}$ (Yang and Chen, 2004; Bellaver et al., 2024). Це надало додаткові аргументи під час відбору ефекторів сайтів зв'язування 4-гідроксікумарину. Молекулярними мішенями докінгу були PDB-структури 6Y1U.B, 6Y1V.B і 2Q1X, а також структурні моделі комплексів FtsZ+4HC (*M. tuberculosis* і *S. aureus*), отримані з фреймів молекулярної динаміки зазначених комплексів в Gromacs (Charmm36 + Tip3).

Остаточну обробку і аналіз скорингових показників фармакофорного пошуку, молекулярного докінгу і молекулярної динаміки здійснювали у програмі Microsoft Excel 2016.

Хемоінформаційний пошук здійснювався із залученням алгоритмів неконтрольованого машинного навчання і реконструкції штучних нейронних мереж, реалізованих у програмі DataWarrior (Sander et al., 2015; Kleino et al., 2022). Для кластеризації зведеної групи лігандів, застосовували методи: PCA (Principal Component Analysis/аналіз головних компонент) (Lever et al., 2017), UMAP (Uniform

Manifold Approximation and Projection/апроксимації та проєкції однорідного різноманіття) (Healy and McInnes, 2024) та SOM (Self-Organizing Maps/карти Кохонена) (Schneider et al., 2009).

Первинну кластеризацію сполук було проведено на підставі генерованої бібліотеки дескрипторів FragFp (Sander et al., 2015; Kleino et al., 2022): Molweight, cLogP, cLogS, H-Acceptors, H-Donors, Total Surface Area, Relative PSA, Polar Surface Area, Shape Index, Molecular Flexibility, Molecular Complexity, Non-H Atoms, Non-C/H Atoms, Electronegative Atoms, Stereo Centers, Rotatable Bonds, Rings Closures, Aromatic Atoms, Symmetric atoms, Largest Ring Size, Small Rings, Carbo-Rings, Hetero-Rings, Saturated Rings, Non-Aromatic Rings, Aromatic Rings, Saturated Carbo-Rings, Non-Saturated Carbo-Rings, Carbo-Aromatic Rings, Saturated Hetero-Rings, Non-Aromatic Hetero-Rings, Hetero-Aromatic Rings, Amides, Amines, Alkyl-Amines, Aromatic Amines, Aromatic Nitrogens, Basic Nitrogens і Acidic Oxygens.

Результати та обговорення. На час дослідження за даними RCSB єдиним ефектором FtsZ), скристалізованим із сайтами зв'язування кумаринів (BP1 і BP2), був 4HC (Almani et al., 2021). Перш за все, нами був проведений аналіз відповідних структур (PDB: 6Y1U.B і 6Y1V.B), оскільки внаслідок відносно невеликого розміру 4HC, і обмежених даних кристалографії, існують об'єктивні перепони для коректної реконструкції фармакофорів, що значно знижує якість фармакофорного скринінгу. Крім того, за даними Almani et al. (2021), існує об'єктивна нерівнозначність сил взаємодії, механізмів та структурно-біологічних наслідків зв'язування 4HC із сайтами BP1 (Site I) та BP2 (Site II), що вказує на потенційну відмінність фармакофорного профілю взаємодій ліганду із зазначеними сайтами (Almani et al. 2021). У зв'язку з цим, нами було виконано відповідне порівняння взаємодій 4HC із сайтами BP1 і BP2, що дозволило визначити потенціал кожного з сайтів з позиції обґрунтування подальшого віртуального скринінгу, комбінаторного дизайну і перспектив розвитку інгібіторів на основі скефолду похідних кумарину. За результатами про-

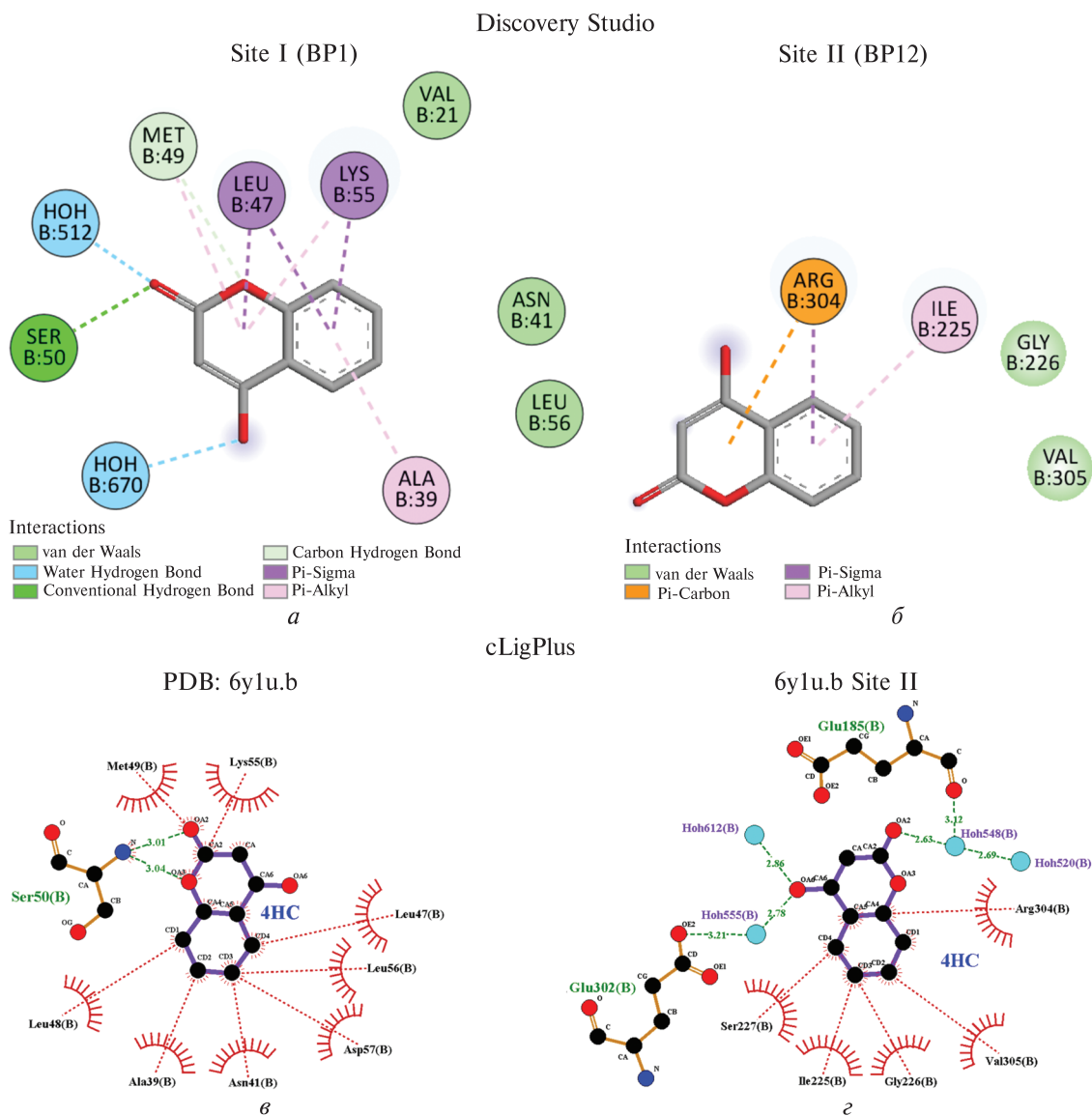


Рис. 1. Карти ліганд-білкових взаємодій 4-гідроксикумарину (PDB: 4HC) з кишенями BP1 і BP2 FtsZ білку *Mycobacterium tuberculosis*. Аналіз виконано із залученням структури 6Y1U, депонованої в RCSB Protein Data Bank. Реконструкції 2D-карт виконані із використанням програмних пакетів BIOVIA Discovery Studio 2024 Client і cLigPlus

веденого аналізу було визначено, що незважаючи на наявність двох конденсованих циклів у структурі ліганду, сайт BP1 не містить амінокислот, які здатні формувати канонічні π - π взаємодії, що, відповідно, робить беззмістовним використання дескрипторів циклічних фрагментів. Зв'язування 4HC відбувається переважно за рахунок гідрофобних взаємодій (Pi-Sigma і Pi-Alkyl), а також водневого

зв'язку, який утворюється між лігандом і Ser50 (рис. 1, а, в). При цьому, принцип компліментарності ліганду і кишені сайту BP1 реалізується лише частково, що вказує на потенціал комбінаторної оптимізації і можливість існування більш перспективних скефолдів ефекторів зазначеного сайту. Ми припускаємо, що основа таких ефекторів може значно відрізнятися від гідроксикумарину 4HC, якій у нашо-

му дослідженні виконував функцію опорного ліганду.

Узагальнений аналіз структурних даних щодо кишені BP1 (рис. 2) показав, що ключовим потенціалом комбінаторної оптимізації та дизайну ефекторів зазначеного сайту може бути реалізація незадіяних донорів і акцепторів водневих зв'язків. Зокрема, під час взаємодії з 4НС визначається щонайменше два вільних донора (Leu40 та Asp75) та три акцептора (Leu48, Leu56 та Lys55) водневих зв'язків (рис. 2, а, H-bonds). Також потрібно враховувати її загальну гідрофобність (рис. 2, в, Hydrophobicity), яка знижує доступність для сольвенту (рис. 2, д, SAS).

У випадку сайту BP2 (рис. 1, б, г), аналіз кристалографічних даних показав не лише відсутність π -взаємодій, а й безпосередніх водневих зв'язків з лігандом (4НС). При цьому, були виявлені водні містки, за допомогою яких 4НС опосередковано взаємодіє з Glu185 і Glu302 (рис. 1, г). Слід зазначити, що у випадку 4НС сайт BP2 помітно поступається потенціалом гідрофобних взаємодій сайту BP1 (рис. 2, г). Це співпадає із попередніми даними стосовно меншої спорідненості 4НС до сайту BP2 ніж до сайту BP1 (Almani et al., 2021). За результатами аналізу кишені BP2 нами було виявлено не менш 5 потенційних донорів і 5 акцепторів, що свідчать про значний потенціал нереалізованих водневих зв'язків (рис. 2, б).

Вище наведене вказує на те, що потенціал обох сайтів явно невичерпаний і можуть існувати сполуки, які мають більш значний рівень спорідненості до зазначених кишень. Крім того, відсутність потенціалу π - π взаємодій свідчить про відсутність прив'язки їх структури безпосередньо до конденсованого гетероциклічного скефолду похідних кумарину.

Як було зазначено раніше, зв'язування 4НС можливо виключно з молекулою FtsZ яка не містить GTP/GDP. Наявність лігандів у кишнях BP1 і BP2 викликає внутрішні зміщення, зокрема, деформації α -спіралі H7. Такі зсуви унеможливають зв'язування гуанозинфосфатів із сайтом NBS (Almani et al., 2021). При цьому, вони аналогічні за принципом, але відмінні за вектором зсувів, які виникають під час зв'язування лігандів в сайті

IDC, де реалізується фактор ліганд-білкової адаптації (Ozheredov et al., 2024; Karpov et al., 2024). Така рухливість сайту IDC значною мірою визначає стратегію створення протоколів подальшого віртуального скринінгу (Karpov et al., 2024; Ozheredov et al., 2024).

З метою з'ясування внеску ліганд-білкового фітінгу до процесу взаємодії ефекторів з сайтами BP1 і BP2 нами було виконано порівняння зазначених кишень кристалографічно доведених комплексів FtsZ з 4НС (PDB: 6Y1U.B і 6Y1V.B), а також структури 2Q1X, яка не містить ефекторів. Візуальну та структурно-біологічну оцінку деформацій сайтів здійснювали із використанням плагіну CavitOmIX до програми PyMOL, що дозволило заробити зліпки внутрішнього об'єму кишень BP1 і BP2 (Catalophore™ — <https://innophore.com/cavitomix/>). Порівняльний аналіз структур вказує на те, що кишені BP1 і BP2 залишаються відкритими навіть за умов відсутності лігандів (рис. 3). Таким чином, зазначені кишені можна обгрунтовано вважати відкритими і доступними для лігандів, але незначний фактор ліганд-білкового припасування тут також присутній.

Аналіз взаємодії кумаринів з кишнями BP1 і BP2 на підставі результатів молекулярної динаміки. Як свідчать дані Almani et al. (2021), у випадку FtsZ *M. tuberculosis* 4НС зв'язується із сайтом BP2 раніше, ніж із сайтом BP1 (Almani et al., 2021). При цьому, через ряд відмінностей механізм їх зв'язування так само, як і взаємна ліганд-обумовлена регуляція кишень сайтів (NB/BP1/BP2) FtsZ білків *M. tuberculosis*, *S. aureus* та *E. coli*, може відрізнятися (Almani et al., 2021; Duggirala et al., 2014; Chiang et al., 2010). Результати аналізу молекулярної динаміки комплексів FtsZ з 4НС підтвердили послідовність та механізми їх формування у випадку *M. tuberculosis*. Проте для *S. aureus* результат дещо відрізнявся. Так, аналіз молекулярної динаміки свідчить про те, що комплекси, які містять по одному ліганду в сайті BP1 або BP2, неминуче дисоціюють на 10–15 і 40–45 нс, відповідно. Проте, при симуляції моделі з двома лігандами, комплекс зберігається до 40–50 нс після чого відбувається дисоціація ліганду з сайту BP2, а ліганд у

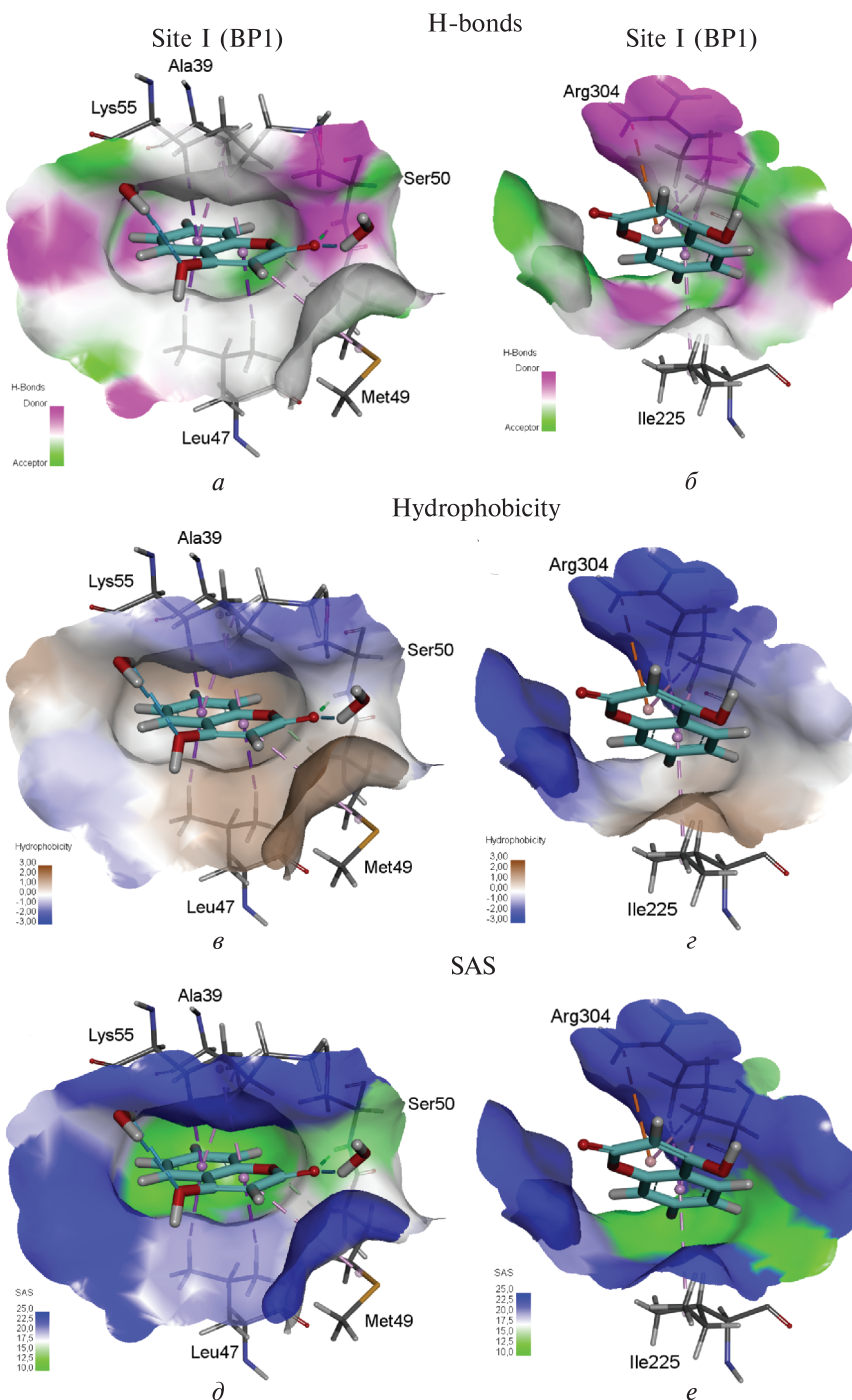


Рис. 2. Аналіз властивостей сайтів BP1 і BP2 FtsZ білку *Mycobacterium tuberculosis* на прикладі комплексів з 4-гідроксикумарином (PDB: 4HC). Показано, що ключову роль у зв'язуванні молекул 4HC відіграють гідрофобні властивості (Hydrophobicity, SAS) карманів BP1 і BP2, а також, водневі зв'язки (H-bonds). Для обох сайтів показана відсутність канонічних π - π взаємодій, а також наявність нереалізованих донорів і акцепторів водневих зв'язків. Це підтверджує перспективність подальшого комбінаторного дизайну і пошуку нових скефолдів ефекторів зазначених сайтів, які не прив'язані до скефолду кумаринів

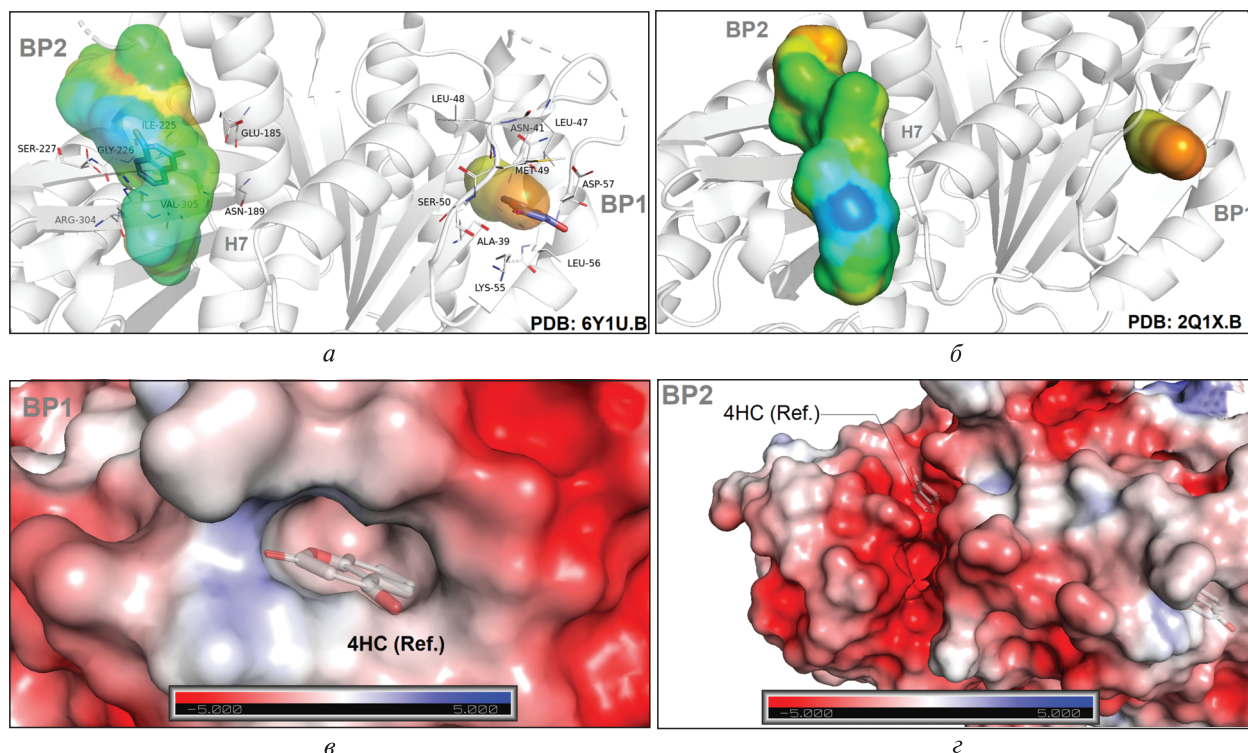


Рис. 3. Підтвердження доступності кишень BP1 і BP2 FtsZ *Mycobacterium tuberculosis* для лігандів у апоформі. *a* – аналіз об’ємів кишень BP1 і BP2 на прикладі комплексу з двома молекулами 4HC (PDB: 6Y1U.B); *б* – аналіз об’ємів кишень BP1 і BP2 на прикладі вільного FtsZ білку (PDB: 2Q1X.B); *в* та *г* – електростатичні поверхні ділянок кишень BP1 і BP2, побудовані за допомогою інструменту APBS, на прикладі вільного FtsZ білку (PDB: 2Q1X.B). Примітка. Ліганди 4HC на рисунках *в* та *г* було перенесено у апоформу з комплексу 6Y1U.B шляхом структурного вирівнювання білкових компонентів структур

сайті BP1 залишається до повного закінчення симуляції (210 нс). Більш того, ліганд у сайті BP1 приймає позу, дуже близьку до задокументованої в кристалографічному комплексі з FtsZ *M. tuberculosis* (рис. 4).

Цікаво те, що саме із сайтом BP1 пов’язані ключові перебудови структури білку, які асоційовані з наявністю або відсутністю GTP та обумовлюють конформаційний перехід $\beta 2/H2$. Зокрема, після дисоціації ліганду з кишені BP1 під час симуляція комплексу з 1 лігандом спостерігали аналогічний $\beta 2 \rightarrow H2$ перехід при повертанні білку у апоформу. Ми припускаємо, що подвійне зв’язування 4HC є невід’ємною умовою формування необхідної конформації кишені сайту BP1 та елементом раніше описаного взаємного впливу кишень молекули FtsZ, відомого як «pocket crosstalk» (Almani et al., 2021). Оскільки виявлені ало-

теричні комунікації кишень BP1 та BP2 реалізовані шляхом деформації α -спіралі H7, ми припускаємо, що тимчасове зв’язування ліганду у сайті BP2 є обов’язковою умовою формування стабільного комплексу 4HC із сайтом BP1 (Almani et al., 2021; Ozheredov et al., 2024).

Визначення контрольної групи речовин. Неспростовним підтвердженням взаємодії лігандів з кишенями BP1 і BP2 є структури 6Y1U і 6Y1V комплексів 4-гідроксикумарину (4HC) з димеризованим FtsZ білком *M. tuberculosis* (Chiang et al., 2010; Almani et al., 2021). Крім того, ще до появи x-гау структур, було встановлено, що природні кумарини здатні проявляти антибактеріальну активність через пригнічення FtsZ-білку *E. coli* (Ma and Ma, 2012). Так, похідні ряду 1,2-бензопірону проявили здатність ефективно пригнічувати ГТФазну актив-

ність та нормальну полімеризацію FtsZ. Зокрема було визначено десять перспективних похідних, з яких найкращі показники IC₅₀ показали скополетин (7-hydroxy-6-methoxychromen-2-one) та дафнетин (7,8-dihydroxychromen-2-one) (Duggirala et al., 2014). Доведено, що скополетин пригнічує активність FtsZ не ГТФ-конкурентним чином, а структурно-біологічні дослідження показали, що взаємодія кумаринів з FtsZ асоційована із петлею T7 та немає безпосереднього зв'язку із сайтом NBS. Водночас, жоден з досліджених похідних кумарину не мав цитотоксичного впливу на лінії ембріональних фібробластів миші (NIH/3T3) та культури ембріональних клітин нирки людини (Duggirala et al., 2014). Також було показано, що довжина клітин *Bacillus subtilis* збільшується у присутності всіх досліджених похідних кумарину, що свідчить про консервативний механізм їх взаємодії з FtsZ та пов'язується авторами із блокуванням формування септи (Duggirala et al., 2014).

Загалом нами було відібрано 10 сполук позитивного контролю (табл. 1), для яких існують неспростовні докази безпосередньої взаємодії з молекулою FtsZ: x-Ray, IC₅₀, інгібування полімеризації і ГТФазної активності.

Визначення ефекторів сайтів BP1 і BP2 на підставі хемоінформаційної кластеризації лігандів. Як було зазначено раніше, ревізія бази даних ChEMBL (www.ebi.ac.uk/chembl/) виявила 379 ефекторів FtsZ. В той же час, докази зв'язування з FtsZ, за виключенням нативних субстратів (GTP і GDP), методами кристалографії та ЯМР доступні лише для 15 сполук. Ще 9 ефекторів відібрані на підставі біохімічних дослідів, представлених Duggirala et al. (2014), і, разом із 4НС, використовувались як позитивний контроль під час проведення дослідження. Також, раніше нами було визначено 104 інгібітора FtsZ, які взаємодіють із сайтом IDC, а також, 23 GTP/GDP-конкурентних інгібітора сайту NBS (Karpov et al, 2024; Ozheriedov et al, 2024; Ozheriedov et al, 2025), що також було враховано під час хемоінформаційного пошуку ефекторів сайтів BP1 і BP2.

Для відбору сполук, структурно близьких до позитивного контролю, були використані інструменти програми DataWarrior. Кластеризацію зведеної групи здійснювали за результа-

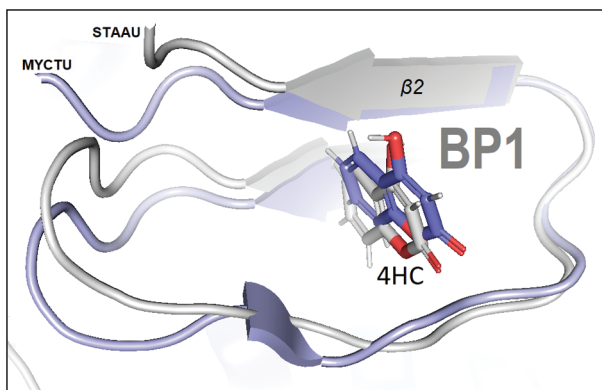


Рис. 4. Порівняння поз 4-гідроксікумарину (4НС) в сайті BP1 FtsZ-білку *Staphylococcus aureus* (STAAU) на останньому фреймі молекулярної динаміки (Gromacs, Charmm36, 210 ns) та експериментальної структури PDB: 6Y1U комплексу 4НС з FtsZ-білком з *Mycobacterium tuberculosis* (MYCTU)

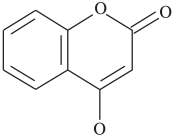
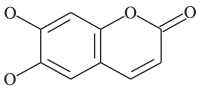
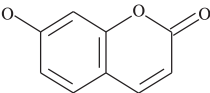
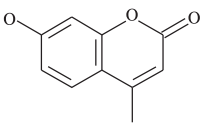
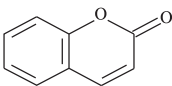
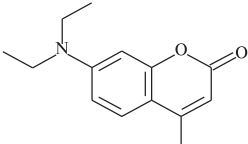
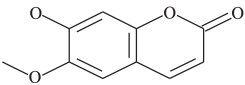
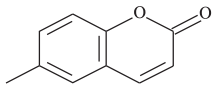
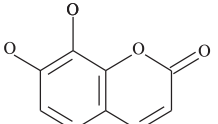
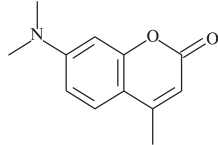
тами аналізу головних компонент (PCA), апроксимації та проєкції однорідного різноманіття (UMAP), а також карт Кохонена (SOM).

Первинну кластеризацію сполук здійснювали на підставі генерованої бібліотеки дескрипторів FragFp, яку у подальшому використовували для отримання масштабованих дескрипторів меншої розмірності: PCA (pc1, pc2, pc3, pc4, pc5, pc6, pc7 і pc8), UMAP (UMAP X, UMAP Y і UMAP Z) і SOM (SOM X і SOM Y), що дозволило позиціонувати речовини у просторі декартових координат та визначати сполуки, близькі за властивостями. Найкращі результати були отримані за допомогою методів UMAP і SOM. При цьому, у випадку UMAP застосовували позиціонування у тривимірному просторі (x, y, z), а у випадку SOM, побудову двовимірних ландшафтні карти. За результатами спільної UMAP-кластеризації (рис. 5, а) контрольні похідні ряду кумарину формують чітко відокремлений кластер (речовини позитивного контролю), що підтверджує коректність застосованого методу. При масштабуванні контрольної групи та визначені найближчих зв'язків подібності до кластеру також приєдналися 3 речовини, які депоновані виключно в ChEMBL (рис. 5, б): quinoxaline (ChEMBL 39444), 2-phenylquinoxaline (ChEMBL69695) і curcumin (ChEMBL116438). При цьому, критеріями внутрішньої подібності групи були кількість потенційних донорів (H-Donors) та

акцепторів водневих зв'язків (H-Acceptors), а також загальна кількість атомів циклічних фрагментів. Для остаточного відбору сполук, структурно

близьких до скефолду кумаринів, нами був застосований метод SOM, який забезпечує більш акуратну диференціацію складних ре-

Таблиця 1. Природні кумарини, для яких існують експериментальні докази безпосередньої взаємодії з FtsZ білком (позитивний контроль дослідження)

Назва	Структура	PubChem ID	IUPAC	Доказ взаємодії
4-Hydroxycoumarin (PDB: 4HC)		54682930	4-hydroxychromen-2-one	PDB ^[1] IC50, IP, IGA ^[2]
Esculetin		5281416	6,7-Dihydroxy-2H-chromen-2-one	IC50, IP, IGA ^[2]
Umbelliferon		5281426	7-hydroxychromen-2-one	IC50, IP, IGA ^[2]
Hymecromone (Сін. 4-Methylumbelliferon)		5280567	7-hydroxy-4-methylchromen-2-one	IC50, IP, IGA ^[2]
Coumarin		323	chromen-2-one	IC50, IP, IGA ^[2]
7-Diethylamino-4-methylcoumarin		7050	7-(diethylamino)-4-methylchromen-2-one	IC50, IP, IGA ^[2]
Scopoletin		5280460	7-hydroxy-6-methoxychromen-2-one	IC50, IP, IGA ^[2]
6-Methylcoumarin		7092	6-methylchromen-2-one	IC50, IP, IGA ^[2]
Daphnetin		5280569	7,8-dihydroxychromen-2-one	IC50, IP, IGA ^[2]
7-Dimethyl-4-methylcoumarin		6867	7-(dimethylamino)-4-methylchromen-2-one	IC50, IP, IGA ^[2]

Примітка. [1] – Almani et al., 2021; RCSB Protein Data Bank: 6YIU.b і 6YIV.b; [2] – Duggirala et al, 2014; IC50, IP (Inhibition of Polymerization), IGA (Inhibition of GTFase Activity)

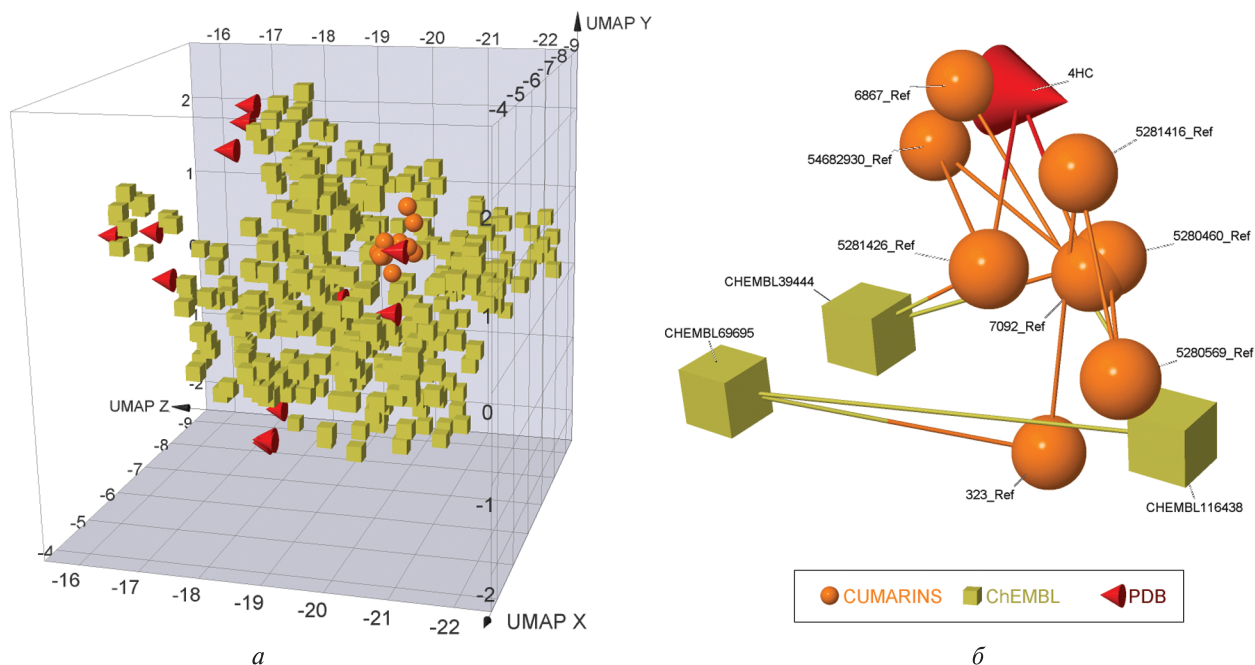


Рис. 5. UMAP-кластеризація експериментально доведених ефекторів FtsZ: *a* – загальна репрезентація хімічного простору актуального дослідження; *б* – кластер позитивного контролю (похідні кумарину). Помаранчеві кулі відповідають біохімічно доведеним ефекторами сайтів BP1 і BP2 (дані Duggirala et al., 2014), червоні конуси – сполуки скристалізовані з FtsZ (за даними RCSB Protein Data Bank), жовті квадрати – ефектори FtsZ з бази даних ChEMBL. *Примітка.* Фокусування на кластер похідних кумарину (рис. «б») було виконано за допомогою функції «Auto zoom» із врахуванням кількості донорів (H-Donors) і акцепторів (H-Acceptors) водневих зв'язків, а також, загальної кількості атомів циклічних фрагментів порівнюваних молекул

човин за подібністю (Egieyeh et al., 2022). Отже, подібні речовини розташовуються у спільних «долинах» 2D-карти, і відокремлюються від інших кластерів «хребтами» хімічного ландшафту, що наряду із відстанню відображує рівень структурної подібності.

Контрольна група кумаринів сформувала 2 близьких кластера об'єднаних спільним ландшафтом (рис. 6, *a*). При цьому, жодна нова речовина не увійшла до «долини» контрольної групи. Проте, на карті SOM наявні 9 кластерів, близьких до позитивного контролю за дистанцією. З них 4 кластери (25 речовин) об'єднані власним ландшафтом і максимально наближені до долини контролю (рис. 6, *б*). Таким чином, відібрано 47 речовин: 10 – речовин контролю і 37 речовин близьких за ландшафтом та/або дистанцією мапи (рис. 6, *б*). Також, контрольні ефектори сайтів IDC та NBS утворювали ізольовані групи, розташова-

ні у власних ландшафтах (рис. 6, *a*). Показово, що ефектори сайтів BP1 і BP2, раніше виявлені із застосуванням методу UMAP, також увійшли до зазначеного ландшафту результуючої групи SOM.

Визначення ефекторів сайтів BP1 і BP2 на підставі результатів фармакофорного пошуку. Для конструювання фармакофорів були використані PDB-структури 6Y1U.B і 6Y1V.B. Відповідні моделі були побудовані за допомогою мережевого сервісу Pharmit (<https://pharmit.csb.pitt.edu/>) на основі структур 4-гідроксікумарину (4HC). Під час реконструкції враховували особливості взаємодій із кишнями сайтів BP1 і BP2, визначені на попередньому етапі дослідження (рис. 1). Для обох сайтів застосовані по 2 дескриптори гідрофобних взаємодій, а також дескриптори акцепторів водневих зв'язків. Ключові відмінності пов'язані, в першу чергу, із обмеженнями кишні за фор-



52

мою, розміром дескрипторів та векторами потенційних взаємодій. Результати скринінгу обмежувались найкращою гіпотезою, показниками прогнозу мінімальної афінності (Minimized Affinity) і відхиленнями оптимізованих структур хітів від фармакофору (Minimized RMSD). За результатами фармакофорного скринінгу отримані 16 хітів, включаючи контрольний ліганд 4HC. Наступний гнучкий докінг в програмі CCDC GOLD показав коректну посадку лише для 13 сполук, які представлено в табл. 2. Структури зазначених сполук були внесені до зведеної бібліотеки, яка включала контрольні сполуки (похідні кумарину), результати хемоінформаційного ранжування і хіти фармакофорного скринінгу.

Молекулярний докінг, AI-ранжування і реконструкція ліганд-білкових комплексів з кишнями BP1 і BP2. Узагальнення результатів хемоінформаційної кластеризації та фармакофорного пошуку дозволило нам відібрати 36 потенційних ефекторів сайтів BP1 та BP2. Також, до цієї групи було додано 10 контрольних лігандів (табл. 1). Таким чином, підсумкова бібліотека склала 46 унікальних речовин, для яких безпосередня взаємодія з FtsZ підтверджена біохімічно. Наступний докінг виконувався із застосуванням програм CCDC GOLD та iGEMDOCK. При цьому, CCDC GOLD застосовували для перевірки гіпотез комплексів, а iGEMDOCK — для отримання даних щодо енергії зв'язування лігандів з кишнями BP1 та BP2.

Докінг в програмі CCDC GOLD виконували із застосуванням ансамблю мішеней, який включав PDB-структури 6Y1U:B та 6UIV:B, а також структури комплексів FtsZ *S. aureus* та *M. tuberculosis* з 4HC, відібрані з фреймів молекулярної динаміки. Незважаючи на те, що кишні BP1 і BP2 є відкритими, існують певні флуктуації форми та об'єму сайту, що частково компенсує ансамблевий протокол докінгу із використанням групи мішеней. Відповідно, для докінгу в CCDC GOLD використовували групу з 10 мішеней, а для iGEMDOCK було застосовано раніше описаний протокол розрахунку середніх показників енергії зв'язування для індивідуальних лігандів (Karpov et al., 2024).

Гнучкий докінг в CCDC GOLD показав, що з 46 відібраних речовин лише 41 демонструє коректні пози розташування в кишні BP1. При цьому, 5 речовин (PubMed CID: 25101149, 60164930, 718179885, 137638354 і 137648670) не мають достовірної посадки в кишню BP1. Ще одна речовина (CID: 103961572) мала стабільно низькі показники фітнес-функції ChemPLP і ASP та була нездатною сідати в кишню BP2. Тому згадані сполуки були виключені із переліка ймовірних ефекторів сайту BP1.

У випадку кишні BP2, докінг в CCDC GOLD спрогнозував існування комплексів для 45 з 46 лігандів. Винятком стала сполука CID: 103961572. Водночас, 5 лігандів, які не сідали в кишню BP1, показали достовірні пози посадки в кишні BP2. Проте, їх положення відрізнялась від кластера контрольних лігандів і було зміщено у бік сайту IDC. Реконструкція ліганд-білкових комплексів даних речовин із застосуванням сервісу Protenix Server (<https://protenix-server.com>) показала, що речовини 25101149 та 71817985 розташовуються у сайті IDC, відомому як канонічний сайт зв'язування 2,6-діфтор-3-метоксібензамідів (Ozheriedov et al., 2025; Karpov et al., 2025). Ще три речовини (CID: 60164930, 137638354

Таблиця 2. Узагальнення хітів фармакофорного пошуку потенційних ефекторів сайтів зв'язування похідних кумарину (BP1 і BP2)

Назва	Pharmit	
	Minimized Affinity	Minimized RMSD
4HC	−6,85352	0,28145
CHEMBL2413334	−3,19066	0,2958
CHEMBL2152507	−3,27743	0,6118
CHEMBL22425	−3,82296	0,68169
CHEMBL468616	−4,35131	0,79999
CHEMBL504829	−5,16979	0,87541
CHEMBL442942	−4,70511	0,89552
CHEMBL453180	−5,27049	0,89853
CHEMBL4079927	−4,35247	0,91603
CHEMBL39444	−5,69006	0,98862
CHEMBL2207288	−6,54427	1,22565
CHEMBL4102611	−5,42857	1,25258
CHEMBL4098327	−6,23146	1,29622

ChEMBL	PubChem	TotalEnergy	
		BP1	BP2
CHEMBL2413346	71817840	-98,2845	-96,4274
CHEMBL2413352	71657194	-95,3787	-85,7701
CHEMBL2413351	71657195	-91,7359	-96,1009
CHEMBL3423282	84377541	-90,6111	-92,9133
CHEMBL3126358	71738318	-90,522	-85,8665
CHEMBL1164137	46907295	-87,9809	-101,575
CHEMBL3423278	84377669	-87,8915	-92,2812
●CHEMBL244743	5281416	-87,7507	-86,0041
●CHEMBL244948	5280569	-87,1474	-87,1891
CHEMBL417799	5154	-86,4036	-83,0937
CHEMBL1651202	25101148	-85,7027	-99,6606
CHEMBL3416825	60171588	-84,8938	-95,3958
●CHEMBL12208	5280567	-83,5027	-77,0225
CHEMBL2180485	71460998	-83,3847	-98,8649
CHEMBL2180486	71462731	-83,272	-93,4459
●CHEMBL71851	5280460	-83,0955	-82,7345
CHEMBL3126155	72793845	-82,9066	-80,6849
CHEMBL2177138	71450208	-82,4729	-99,8866
CHEMBL458645	320829	-81,2833	-88,8945
●CHEMBL51628	5281426	-80,5638	-75,2703
CHEMBL2413342	73347578	-79,4185	-83,2567
CHEMBL442942	72878	-79,4062	-80,4199
CHEMBL2413336	71817836	-78,887	-79,2981
CHEMBL450001	18403949	-77,3247	-76,7892
CHEMBL453452	3544383	-76,0296	-77,2169
●CHEMBL443436	7092	-75,2762	-65,797
CHEMBL2413340	71817838	-74,6649	-74,7481
CHEMBL22425	11461	-74,5238	-78,5835
CHEMBL4102611	45120136	-73,9581	-77,9664
●CHEMBL301141	54682930	-73,9442	-74,197
●CHEMBL3186529	6867	-73,4485	-73,4607
CHEMBL4079927	137652240	-71,8853	-81,6065
●CHEMBL6466	323	-71,7765	-63,9019
CHEMBL468614	10630958	-71,4733	-76,9443
CHEMBL504829	16094695	-70,6492	-70,3514
CHEMBL39444	7045	-68,2111	-64,6405
CHEMBL453180	820515	-67,7091	-72,4443
CHEMBL468616	17999355	-66,9474	-64,5336
CHEMBL1885859	162162	-64,229	-67,3576
CHEMBL69695	78725	-1,00845	-21,1283

Рис.7. Ранжування ефекторів сайтів BP1 і BP2 на підставі показника енергії зв'язування (TotalEnergy). Узагальнена вибірка з групи експериментально-підтверджених ефекторів FtsZ-білків (RCSB+ChEMBL) ґрунтується на результатах хемоінформаційного і фармакофорного пошуку, результатах молекулярного докінгу в програмах CCDC GOLD і iGEMDOCK, а також уточнення окремих гіпотез шляхом конкурентної AI-реконструкції комплексів із залученням сервісу Protenix Server. Наведені сполуки ранжовані за спорідненістю до кишені сайту BP1. *Примітка.* ● – контрольна група похідних кумарину, для яких існують біохімічні (IC₅₀, Duggirala et al. 2014), і/або кристалографічні підтвердження взаємодії (Almani et al., 2021)

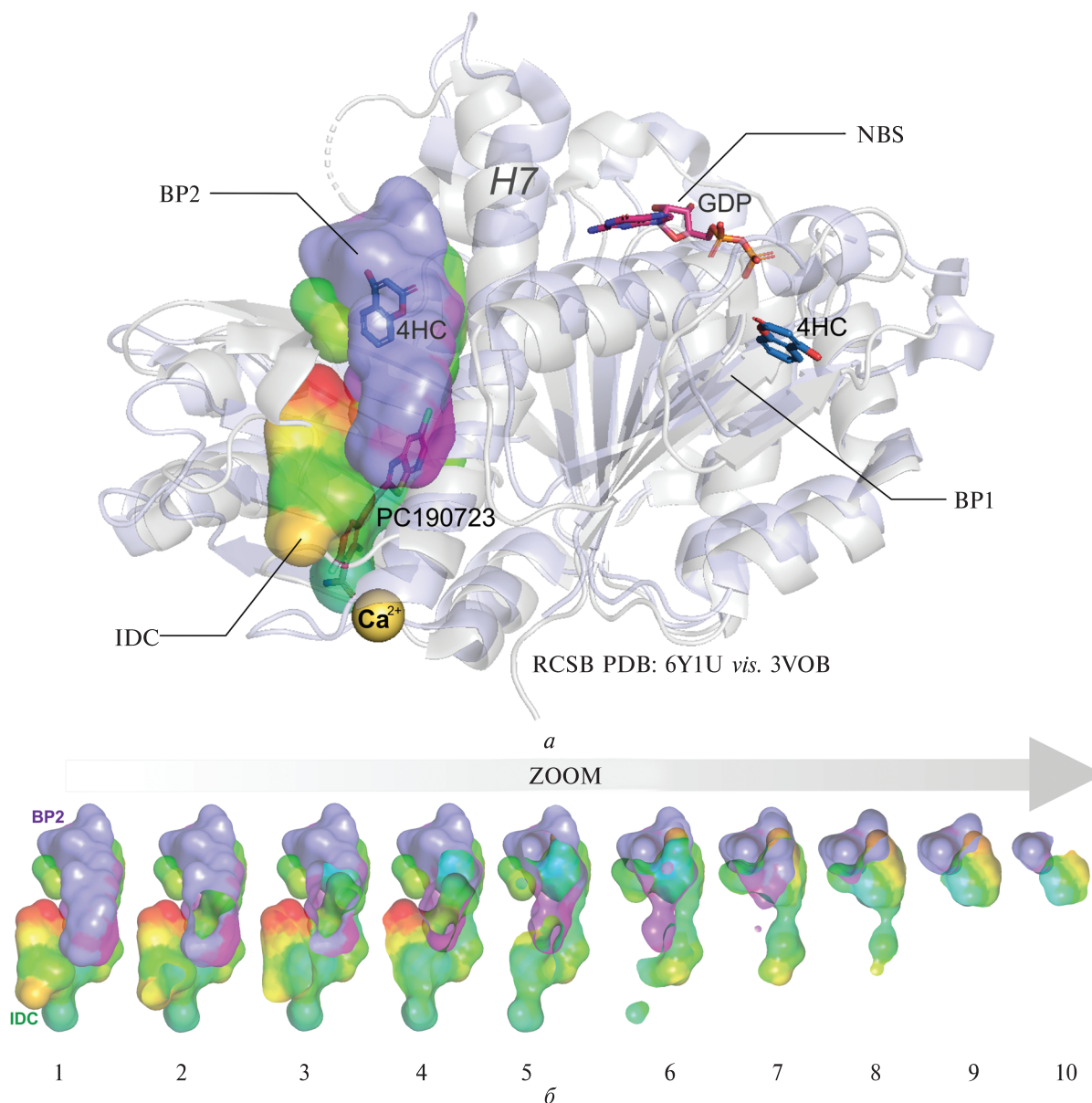


Рис. 8. Перекриття об'ємів сайту BP2 (сайт зв'язування похідних кумарину) та сайту інтердоменної щілини (IDC) при структурному вирівнюванні кристалографічно-підтверджених комплексів, отриманих із RCSB Protein Data Bank: а – структурне вирівнювання комплексу FtsZ білку *M. tuberculosis* з 4-гідроксікумарином (4HC), та комплексу FtsZ білку *S. aureus* з IDC-специфічним інгібітором PC190723; б – Перекриття об'ємів сайтів BP2 та IDC при зумуванні в програмі PyMOL. Зліпки об'ємів сайтів було отримано за технологією Catalophore™ із використанням плагіну CavitOmiX

та 137648670) показали альтернативні пози докінгу та AI-реконструкції і були виключені зі списку можливих ефекторів сайтів BP1 та BP2. Таким чином, список було скорочено до 40 речовин.

Для оцінки потенційної енергії зв'язування відібраних речовин із сайтами BP1 та BP2 було застосовано редокінг у програмі iGEMDOCK для здійснення кількісної оцінки ліганд-білкових взаємодій (TotalEnergy) із врахуванням

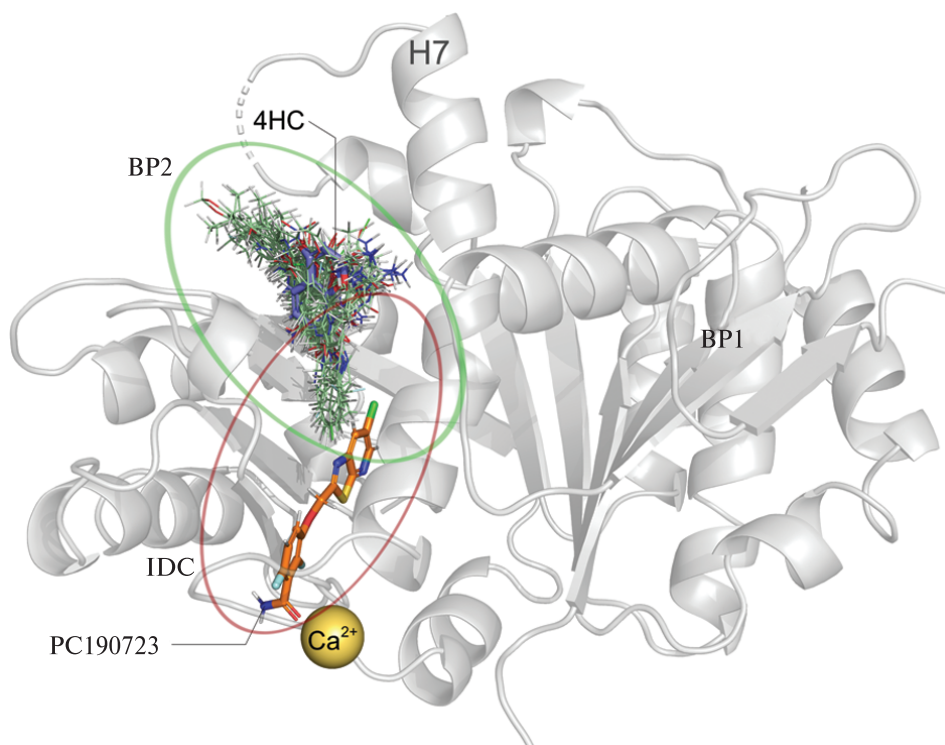


Рис. 9. Результат молекулярного докінгу хітів хемоінформаційного пошуку і фармакофорного скринінгу у кишені BP2/IDC. Молекулярний докінг в програмі CCDC GOLD показав, що незважаючи на доступність об'єму великої кишені BP2/IDC відібраним сполукам притаманна локалізація у ділянці субкишені BP2. При цьому, частина ефекторів, яка визначилась нездатною зв'язуватись із кишенню BP1, показала комфортне позиціонування у кишені BP2. На нашу думку це обумовлюється доступністю спільного об'єму великої кишені BP2/IDC і визначає зазначені сполуки як потенційні специфічні ефектори сайту BP2

внеску водневих зв'язків (H-Bonds), сил Ван-дер-Ваальса (vdW) та електростатики (Elec): $\text{TotalEnergy (Fitness)} = \text{H-Bonds} + \text{vdW} + \text{Elec}$ (Yang and Chen, 2004; Bellaver et al., 2024). Отримані результати підтвердили посадку відібраних сполук у кишені BP1 і BP2. Подальше ранжування речовин виконували за показниками «TotalEnergy», розрахованими для BP1, оскільки саме цей сайт пов'язують із інгібіторною дією 4HC (Almani et al., 2021). Усі сполуки контрольної групи (табл. 1) мали відносно схожі показники енергій зв'язування з BP1 та BP2 із незначною перевагою на користь BP1 (рис. 7). Речовина ChEMBL69695 (CID: 78725) практично не мала спорідненості до кишені BP1 та мала низький показник енергії зв'язування її у кишені BP2. На підставі цього її було виключено із списку можливих ефекторів обох сайтів. Водночас, деякі з ре-

човин мали кращі показники «TotalEnergy» взаємодії з BP2. З огляду на те, що кишеня BP2 у декілька разів перевищує за об'ємом кишенню BP1 (рис. 3) та демонструє більш вигідну енергією зв'язування окремих речовин, дозволяє зробити припущення про те, що потенціал кишені BP2 та її спільного простору з кишенню IDC, яка також належить до міжмолекулярної щілини, значною мірою невичерпаний. По суті, ці два сайти є полюсами єдиної суперкишені, які асоціюються з речовинами різних скефолдів. Так, каталофорні зліпки CavitOmIX, побудовані для структур FtsZ *M. tuberculosis* в комплексі з 4HC (PDB: 6Y1U.B) і FtsZ *S. aureus* в комплексі з PC190723, засвідчили значне взаємне перекриття кишень (рис. 8, а), що свідчить на користь існування єдиного фармацевтичного простору суперкишені BP2/IDC (рис. 8, б). Таким чином, можна при-

Таблиця 3. Підсумкова група ефекторів сайтів BP2 і BP2

ChEMBL/PDB	PubChem	Назва (IUPAC Name)
<i>Ефектори сайтів BP1 і BP2</i>		
●CHEMBL301141	54682930	4HC = 4-Hydroxycoumarin = 4-hydroxychromen-2-one
●CHEMBL244743	5281416	Esculetin = 6,7-dihydroxychromen-2-one
●CHEMBL244948	5280569	7,8-dihydroxychromen-2-one
●CHEMBL12208	5280567	7-hydroxy-4-methylchromen-2-one
●CHEMBL71851	5280460	7-hydroxy-6-methoxychromen-2-one
●CHEMBL51628	5281426	7-hydroxychromen-2-one
●CHEMBL443436	7092	6-methylchromen-2-one
●CHEMBL3186529	6867	7-(dimethylamino)-4-methylchromen-2-one
●CHEMBL6466	323	Coumarin = chromen-2-one
CHEMBL2413346	71817840	3-(4-tert-butylphenyl)-5-quinoxalin-2-ylbenzamide
CHEMBL2413352	71657194	2-[[2-(4-tert-butylphenyl)quinoxalin-5-yl]methyl]guanidine
CHEMBL2413351	71657195	2-[[2-(3-tert-butylphenyl)quinoxalin-5-yl]methyl]guanidine
CHEMBL3423282	84377541	(E)-3-(2,4-dichlorophenyl)-1-(2-methylbenzimidazol-1-yl)prop-2-en-1-one
CHEMBL417799	5154	24-methyl-5,7,18,20-tetraoxa-24-azoniahexacyclo[11.11.0.0.02,10.04,8.014,22.017,21]tetracos-1(24),2,4(8),9,11,13,15,17(21),22-nonaene
CHEMBL3126155	72793845	2,2,2-trifluoroethyl N-[2-cyclohexyl-6-(dimethylamino)-3H-benzimidazol-5-yl]carbamate
CHEMBL2413342	73347578	2-(4-tert-butylphenyl)quinoxaline
CHEMBL442942	72878	3,5-dimethoxybenzamide
CHEMBL2413336	71817836	2-(3-fluorophenyl)quinoxaline
CHEMBL450001	18403949	5-methoxy-2-nitrobenzamide
CHEMBL453452	3544383	2,6-difluoro-3-methoxybenzamide
CHEMBL2413340	71817838	2-(3-tert-butylphenyl)quinoxaline
CHEMBL22425	11461	3-methoxybenzoic acid
CHEMBL4102611	45120136	2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide
CHEMBL504829	16094695	3-methoxy-2-methylbenzamide
CHEMBL39444	7045	quinoxaline
CHEMBL453180	820515	3-methoxy-N-methylbenzamide
CHEMBL468616	17999355	2-chloro-6-fluoro-3-methoxybenzamide
CHEMBL1885859	162162	1-methylquinoxalin-1-ium
<i>Ефектори сайту BP2/IDC</i>		
CHEMBL3126358	71738318	butyl N-[2-cyclohexyl-6-(dimethylamino)-3H-benzimidazol-5-yl]carbamate
CHEMBL1164137	46907295	16-[3-(4-chlorophenoxy)propoxy]-17-methoxy-5,7-dioxo-13-azoniapentacyclo[11.8.0.0.02,10.04,8.015,20]henicos-1(13),2,4(8),9,14,16,18,20-octaene
CHEMBL3423278	84377669	(E)-3-(4-fluorophenyl)-1-(2-methylbenzimidazol-1-yl)prop-2-en-1-one
CHEMBL1651202	25101148	butyl N-[2-cyclohexyl-6-(diethylamino)-3H-benzimidazol-5-yl]carbamate
CHEMBL3416825	60171588	2-chloro-5-[(E)-3-chloro-4-(3,5-dihydroxyphenyl)but-2-enyl]benzene-1,4-diol
CHEMBL2180485	71460998	2-[[4-(4-tert-butylphenyl)pyridin-2-yl]methyl]guanidine
CHEMBL2180486	71462731	2-[[3-(4-tert-butylphenyl)phenyl]methyl]guanidine
CHEMBL2177138	71450208	2-[[6-(4-tert-butylphenyl)pyrimidin-4-yl]methyl]guanidine
CHEMBL458645	320829	2,5-dimethoxybenzamide
CHEMBL4079927	137652240	2,6-difluoro-3-propan-2-yloxybenzamide
CHEMBL468614	10630958	2-fluoro-3-methoxybenzamide

Примітка. ● – контрольні ефектори сайтів BP1 і BP2 для яких існують експериментальні докази взаємодії з FtsZ.

пустити, існування специфічних ефекторів кишени BP2. Незважаючи на наявність у їх структурі ознак скефолду кумарину, певні особливості структури і, зокрема, розмір таких лігандів ускладнюють їх взаємодію з кишеною сайту BP1. Відомо, що, у разі бензамідів, ділянка кишени IDC протилежна домену взаємодії з Ca^{2+} розглядається як основний резерв комбінаторного дизайну (Karpov et al., 2025; Huescas et al., 2021). Аналогічно, для ряду речовин актуального дослідження лише кишения BP2 має достатній об'єм для комфортного розташування таких лігандів. При цьому, на відміну від кишени BP1, докінг в програмі CCDC GOLD підтверджує наявність комфортних поз для всіх відібраних речовин виключно у кишени BP2 (рис. 9).

Таким чином, групу відібраних ефекторів можна поділити на дві підгрупи: 1) «справжні» ефектори подібні 4НС, ефект яких насамперед асоціюється з кишеною BP1, і 2) сполуки, умовно визначені нами, як ефектори суперкишени BP2/IDC, до яких належать похідні, які мають великий розмір та не здатні зв'язуватися з кишеною BP1 (табл. 3). Враховуючи, що субдомен зв'язування останніх асоційований, насамперед, із сайтом BP2, механізм їх дії повинен бути пов'язаним з алостеричними здвигами, але мати відмінності від дії канонічних ефекторів сайту IDC.

Дослідження з молекулярного докінгу було виконано за допомогою програмного забезпечення CCDC GOLD (CSD Software Portfolio), люб'язно наданого Кембриджським центром кристалографічних даних (CCDC) у рамках гранту Міжнародної програми Френка Аллена для підтримки досліджень і освіти (Frank Allen International Research and Education Program, FAIRE) – ID: 21554.

Дотримання етичних стандартів. Стаття не містить жодних досліджень, які були виконані із використанням лабораторних препаратів, клітинних ліній або інтактних організмів тварин чи людини.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність будь-якого конфлікту інтересів.

Фінансування. Робота виконана в рамках бюджетної теми Національної академії наук України (номер державної реєстрації 0120U100937, 2020-2024).

IDENTIFICATION OF BACTERIAL FtsZ EFFECTORS TARGETING THE SITES OF COUMARIN BINDING

P.A. Karpov, D.S. Ozheriedov, S.P. Ozheredov, O.M. Demchuk, S.I. Spivak, Ya.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics
NAS of Ukraine,
Baidy-Vyshnevetskoho str., 2A, Kyiv, 04123, Ukraine

E-mail: karpov@nas.gov.ua; karpov@ifbg.org.ua

There is a large group of bacterial FtsZ inhibitors, the biological activity of which has been confirmed biochemically. However, the sites of protein-ligand interaction for most of them remain unknown, significantly complicating the further search and combinatorial design of FtsZ inhibitors. This study presents the results of bioinformatic analysis of bacterial FtsZ effectors, targeting the sites of 4-hydroxycoumarin binding (BP1 and BP2). Here we present new data, based on original results of pharmacophore screening, chemoinformatics, molecular docking, molecular dynamics simulations, AI-predictions, etc. The object of the study was a combined library of 379 compounds, formed based on revision of the structural database RCSB Protein Data Bank and biochemically proven FtsZ effectors from ChEMBL. Based on the results of a comprehensive study, 39 compounds were selected, of which 28 were identified as effectors of the BP1 and BP2 sites, and another 11 as specific effectors of the BP2 site, located in the BP2/IDC superpocket.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Abraham, M., Alekseenko, A., Basov, V., et al., GROMACS 2024.5 Manual, 2024, <https://doi.org/10.5281/zenodo.14732060>
- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., et al., Addendum: Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3, *Nature*, 2024, vol. 636, no. 8042, pp. E4. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08416-7>
- Alnami, A., Norton, R.S., et al., Conformational Flexibility of A Highly Conserved Helix Controls Cryptic Pocket Formation in FtsZ, *J. Mol. Biol.*, 2021, vol. 433, no. 15, pp. 167061. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167061>
- Andreu, J.M., Huescas, S., Araújo-Bazán, L., et al., The search for antibacterial inhibitors targeting cell division protein FtsZ at its nucleotide and allosteric binding sites, *Biomedicine*, 2022, vol. 10, no. 8, pp. 1825. <https://doi.org/10.3390/biomedicine10081825>
- Bellaver, E.H., da Costa, I.M., Redin, E.E., et al., The fermented milk can be a natural ally against obesity? Investigation of Bovine Milk Fermentation by *Lactocaseibacillus casei* LBC 237, Screening, and In

- Silico Predictions of Bioactive Peptides for Obesity Control, *Intelligent Pharmacy*, 2024, PII: S2949-866X(24)00069-8. Reference: IPHA 125. <https://doi.org/10.1016/j.ipha.2024.05.009>
- Berman, H., Henrick, K., and Nakamura, H., Annotating the worldwide Protein Data Bank, *Nat. Struct. Biol.*, 2003, vol. 10, no. 12, pp. 980. <https://doi.org/10.1038/nsb1203-980>
- Burley, S.K., Bhatt, R., Bhikadiya, C., et al., Updated resources for exploring experimentally-determined PDB structures and Computed Structure Models at the RCSB Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.*, 2025, vol. 53, no. D1, pp. D564–D574. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1091>
- Bye, A., and King, H.K., The biosynthesis of 4-hydroxycoumarin and dicoumarol by *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *Biochem J.*, 1970, vol. 117, no. 2, pp. 237–245. <https://doi.org/10.1042/bj1170237>
- ByteDance AML AI4Science Team, Xinshi Chen, Yuxuan Zhang, et al., Protenix – Advancing Structure Prediction Through a Comprehensive AlphaFold3 Reproduction, 2025, *bioRxiv*, 01.08.631967. <https://doi.org/10.1101/2025.01.08.631967>
- Chiang, C.C., Cheng, M.J., Peng, C.F., et al., A novel dimeric coumarin analog and antimycobacterial constituents from *Fatoua pilosa*, *Chem. Biodiversity*, 2010, vol. 7, no. 7, pp. 1728–1736. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900326>
- Crunkhorn, S., Identifying novel antibiotic targets, *Nature reviews. Drug discovery*, 2025, vol. 24, no. 5, pp. 334. <https://doi.org/10.1038/d41573-025-00059-1>
- Duggirala, S., Nankar, R. P., Rajendran, S., et al., Phytochemicals as inhibitors of bacterial cell division protein FtsZ: coumarins are promising candidates. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014, vol. 174, no. 1, pp. 283–296. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1056-2>
- Dyer, N., Tubulin and its prokaryotic homologue FtsZ: a structural and functional comparison, *Sci. Progress*, 2009, vol. 92(Pt 2), pp. 113–137. <https://doi.org/10.3184/003685009X461431>
- Egieyeh, S., Syce, J., Christoffels, A., et al., Exploration of Scaffolds from Natural Products with Antiplasmodial Activities, Currently Registered Antimalarial Drugs and Public Malarial Screen Data, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2016, vol. 21, no. 1, pp. 104. <https://doi.org/10.3390/molecules21010104>
- Elfmann, C., and Stülke, J., PAE viewer: a webserver for the interactive visualization of the predicted aligned error for multimer structure predictions and crosslinks, *Nucleic Acids Res.*, 2023, vol. 51, no. W1, W404–W410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad350>
- Faguy, D.M., and Doolittle, W.F., Cytoskeletal proteins: the evolution of cell division, *Current biology: CB*, 1998, vol. 8, no. 10, pp. R338–R341. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)70216-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70216-7)
- Gruber, K., Steinkellner, G., and Gruber C., Determining novel enzymatic functionalities using three-dimensional point clouds representing physico chemical properties of protein cavities, Application filed by Karl Franzens Universitaet Graz, ACIB GmbH. 2015. US 20150302142A1
- Gurnani, M., Rath, P., Chauhan, A., et al., Inhibition of Filamentous thermosensitive mutant-Z protein in *Bacillus subtilis* by cyanobacterial bioactive compounds, *Molecules*, 2022, vol. 27, no. 6, pp. 1907. <https://doi.org/10.3390/molecules27061907>
- Healy, J., and McInnes, L., Uniform manifold approximation and projection, *Nat. Rev. Methods Primers*, 2024, vol. 4, pp. 82. <https://doi.org/10.1038/s43586-024-00363-x>
- Hendlich, M., Rippmann, F., and Barnickel, G., LIGSITE: automatic and efficient detection of potential small molecule-binding sites in proteins, *J. Mol. Graph. Model.*, 1997, vol. 15 no. 6, pp. 359–363. [https://doi.org/10.1016/s1093-3263\(98\)00002-3](https://doi.org/10.1016/s1093-3263(98)00002-3)
- Hetmann, M., Langner, C., Durmaz, V., et al., Identification and validation of fusidic acid and flufenamic acid as inhibitors of SARS-CoV-2 replication using DrugSolver CavitomiX, *Scientific Reports*, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 11783. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39071-z>
- Jones, G., Willett, P., Glen, R.C., et al., Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking, *J. Mol. Biol.*, 1997, vol. 267, no. 3, pp. 727–748. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>
- Karpov, P.A., Ozheriedov, D.S., Ozheredov, S.P., et al., Identification of FtsZ Interdomain Cleft Effectors Based on Pharmacophore Search and Molecular Docking, *Cytol. Genet.*, 2024, vol. 58, no. 5, pp. 371–384. <https://doi.org/10.3103/S0095452724050050>
- Kleino, I., Frolovaitė, P., Suomi, T., et al., Computational solutions for spatial transcriptomics, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 2022, vol. 20, pp. 4870–4884. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.08.043>
- Laskowski, R.A., and Swindells, M.B., LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery, *J. Chem. Inf. Model.*, 2011, vol. 51, no. 10, pp. 2778–2786. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>
- Lever, J., Krzywinski, M., and Altman, N., Principal component analysis, *Nat. Methods*, 2017, vol. 14, pp. 641–642. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4346>
- Liu, W., Wu, L., Liu, W., et al., Design, synthesis and biological evaluation of novel coumarin derivatives as multifunctional ligands for the treatment of Alzheimer's disease, *Eur. J. Med. Chem.*, 2022, vol. 242, pp. 114689. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114689>
- Ma, S., and Ma, S., The development of FtsZ inhibitors as potential antibacterial agents, *Chem. Med. Chem.*, 2012, vol. 7, no. 7, pp. 1161–1172. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200156>
- Mariani, V., Biasini, M., Barbato, A., et al., IDDT: a

- local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests, *Bioinformatics*, 2013, vol. 29, no. 21, pp. 2722–2728. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt473>
- Matsui, T., Yamane, J., Mogi, N., et al., Structural reorganization of the bacterial cell-division protein FtsZ from *Staphylococcus aureus*, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 2012, vol. 68, no. 9, pp. 1175–1188. <https://doi.org/10.1107/S0907444912022640>
- Monserat-Martinez, A., Gambin, Y., and Sieracki, E., Thinking Outside the Bug: Molecular Targets and Strategies to Overcome Antibiotic Resistance, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 6, pp. 1255. <https://doi.org/10.3390/ijms20061255>
- Ozheredov, D.S., and Karpov, P.A., Comparative analysis of allosteric rearrangements in FtsZ protein structure induced by benzamide and 4-hydroxycoumarine compounds, *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*, 2024, vol. 35, pp. 164–169. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v35.1679>
- Ozheredov, D.S., Ozheredov, S.P., Demchuk, O.M., et al., Ligand-Induced Variability of the FtsZ Protein Interdomain Site Pocket, *Cytol. Genet.*, 2024, vol. 58, pp. 275–282. <https://doi.org/10.3103/S0095452724040078>
- Ozheredov, D.S., Ozheredov, S.P., Demchuk, O.M., Spivak, S.I., Blume, Ya.B., and Karpov, P.A., Identification of FtsZ Protein Nucleotide-Binding Site Effectors Based on Cheminformatics and Structural Biological Analysis, *Cytol. Genet.*, 2025, vol. 59, no. 4, pp. 347–358. <https://doi.org/10.3103/S0095452725040073>
- Parigger, L., Krassnigg, A., Hetmann, M., et al., CavitOmiX drug discovery: engineering antivirals with enhanced spectrum and reduced side effects for arboviral diseases, *Viruses*, 2024, vol. 16, no. 8, pp. 1186. <https://doi.org/10.3390/v16081186>
- Pham, P.V., Medical Biotechnology: Techniques and Applications, Chapter 19 In. *Omics Technologies and Bio-Engineering*, Academic Press, 2019, pp. 449–469. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00019-1>
- Pradhan, P., Margolin, W., and Beuria, T.K., Targeting the achilles heel of FtsZ: The interdomain cleft, *Front Microbiol.*, 2021, vol. 12, pp. 732796. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.732796>
- Rayevsky, A., Samofalova, D., Ishchenko, L., et al., Structure-based virtual screening and biological evaluation of novel inhibitors of mycobacterium Z-ring formation, *J. Cell. Biochem.*, 2022, vol. 123, no. 5, pp. 852–862. <https://doi.org/10.1002/jcb.30232>
- Sander, T., Freyss, J., von Korff, M., et al., DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis, *J. Chem. Inf. Model.*, 2015, vol. 55, no. 2, pp. 460–473. <https://doi.org/10.1021/ci500588j>
- Scheffers, D., and Driessen, A.J., The polymerization mechanism of the bacterial cell division protein FtsZ, *FEBS Lett.*, 2001, vol. 506, no. 1, pp. 6–10. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02855-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02855-1)
- Schneider, P., Tanrikulu, Y., and Schneider, G., Self-organizing maps in drug discovery: compound library design, scaffold-hopping, repurposing, *Curr. Med. Chem.*, 2009, vol. 16, no. 3, pp. 258–266. <https://doi.org/10.2174/092986709787002655>
- Sharma, A.K., Poddar, S.M., Chakraborty, J., et al., A mechanism of salt bridge-mediated resistance to FtsZ inhibitor PC190723 revealed by a cell-based screen, *Mol. Biol. Cell*, 2023, vol. 34, no. 3. <https://doi.org/10.1091/mbc.E22-12-0538>
- Steinkellner, G., Rader, R., and Thallinger, G.G., VASCo: computation and visualization of annotated protein surface contacts, *BMC Bioinformatics*, 2009, vol. 10, no. 32. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-32>
- Sunseri J., and Koes, D.R., Pharmit: interactive exploration of chemical space, *Nucleic Acids Res.*, 2016, vol. 44, no. W1, pp. W442–W448. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw287>
- Suresh, M., Naicker, K., Solanki, J., et al., Ligand-based pharmacophore modelling, virtual screening and docking studies to identify potential compounds against FtsZ of *Mycobacterium tuberculosis*, *Indian J. Tuberculosis*, 2023, vol. 70, no. 4, pp. 430–444. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2023.03.003>
- Tan, C.M., Therien, A.G., Lu, J., et al., Restoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility to β -lactam antibiotics, *Sci. Transl. Med.*, 2012, vol. 4, no. 126, pp. 126ra35. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003592>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., et al., SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic Acids Res.*, 2018, vol. 46, no. W1, pp. W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Xu, J., and Zhang, Y., How significant is a protein structure similarity with TM-score=0.5? *Bioinformatics*, 2010, vol. 26, no. 7, pp. 889–895. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq066>
- Yang, J.M., and Chen, C.C., GEMDOCK: a generic evolutionary method for molecular docking, *Proteins*, 2004, vol. 55, no. 2, pp. 288–304. <https://doi.org/10.1002/prot.20035>

Надійшла в редакцію 07.06.2025
Після доопрацювання 20.07.2025
Прийнята до друку 18.09.2025