

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ, ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ, ՄՇԱԿՈՒՅԹԻ և ՄՊՈՐՏԻ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ  
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԱԲԵԼՅԱՆ ՆԱՐԵԿ ՆՎԵՐԻ

*Pseudomonas aeruginosa* ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ԹՎՈՐՈՒՄ-ՍԵՆՍԻՒԼԳԻ ՀԱՄԱԿԱՐԳԵՐԻ  
ՊՈՏԵՆՑԻԱԼ ԱՐԳԵԼԱԿԻԶՆԵՐԻ ՈՐՈՆՈՒՄԸ

Գ.00.02 – Կենսաֆիզիկա, կենսաինֆորմատիկա մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2022

---

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ, КУЛЬТУРЫ И СПОРТА РА  
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АБЕЛЯН НАРЕК НВЕРОВИЧ

*ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ СИСТЕМ КВОРУМ СЕНСИНГА  
БАКТЕРИЙ Pseudomonas aeruginosa*

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности  
03.00.02 – Биофизика, биоинформатика

ЕРЕВАН – 2022

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում  
Գիտական ղեկավար՝

կեն. գիտ. թեկնածու, դոցենտ  
Ա.Ա. Հովհաննիսյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կենս. գիտ. դոկտոր, դոցենտ  
Ա. Պ. Անտոնյան

կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ  
Հ. Հ. Փանոսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

ՀՀ ԳԱԱ Գիտակրթական  
միջազգային կենտրոն

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2022թ. հուլիսի 19-ին ժամը 12<sup>00</sup>-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈԿ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2022 թ. հունիսի 8-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,  
կենս. գիտ. դոկտոր, դոցենտ

Մ.Ա. Փարսադանյան

---

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель:

кандидат биол. наук, доцент  
А.А. Оганесян

Официальные оппоненты:

доктор биол. наук, доцент  
А. П. Антонян

кандидат биол. наук, доцент  
О. А. Паносян

Ведущая организация:

Научно-образовательный  
международный центр НАН РА

Защита диссертации состоится 19-го июля 2022г. в 12<sup>00</sup> часов на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 8-го июня 2022г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,  
доктор биол. наук, доцент



М.А. Парсаданян

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Инфекционные заболевания являются одной из основных причин смерти во всем мире. Не только появление новых инфекционных заболеваний, но и повторное проявление смертельных инфекционных заболеваний, представляют огромную угрозу для здоровья и благополучия населения [Wilson et al., 2002]. Подавляющее большинство инфекций в основном обусловлено условно-патогенными микроорганизмами, которые образуют биопленки, где секретируют сигнальные молекулы, ответственные за клеточную коммуникацию. При достижении очень высокой плотности популяции, именуемой кворум-сенсингом (КС), способствуя экспрессии систем регуляторной сети КС, включающих гены патогенности, в т.ч. резистентности к антимикробным препаратам [Jiang et al., 2019] и множественной лекарственной резистентности [Rutherford et al. 2012].

В настоящее время резистентность к антибиотикам является одной из глобальных проблем общественного здравоохранения. Арсенал антибиотиков, применяемых сегодня при антиинфекционной терапии, резко сокращается. Срочно требуется разработка новых стратегических подходов, основанных на поиске соединений, не убивающих патогенные бактерии за счет подавления их синтеза, а направленных на ключевые факторы систем КС. Предполагается, что устойчивость к таким антивирулентным соединениям будет вырабатываться медленнее, т.к. они не будут влиять на гены отбора.

В 2017 ВОЗ опубликовала список наиболее смертельных патогенов, для которых срочно необходимы новые антибиотики, среди которых критически приоритетной является *Pseudomonas aeruginosa*.

Показано, что лекарственные препараты, воздействующие на одну мишень, не всегда могут оказывать желаемый эффект на организменном уровне. В борьбе с инфекционными заболеваниями и проблемами, связанными с антибактериальной устойчивостью, предлагаются инновационные многоцелевые стратегии. Ретроспективно установлено, что многие эффективные антибиотики действуют сразу на несколько белковых мишеней [Chiarelli et al. 2018, Gray et al. 2020]. Ингибирование нескольких мишеней одного и того же метаболического пути является эффективной стратегией благодаря синергизму, улучшающему клинический потенциал и повышающему терапевтическую эффективность [Oldfield et al. 2014].

Стремительное технологическое развитие и модернизация научных экспериментальных подходов в фармакологической промышленности, разработки и открытия новых лекарственных средств привели к значительному улучшению системы здравоохранения. Методы и подходы компьютерного моделирования, такие как молекулярный докинг, крупномасштабный виртуальный скрининг, моделирование молекулярной динамики, поиск соотношения структура-активность и т. д., значительно ускорили процесс drug design-a [Yu & MacKerell 2017, Cherkasov et al. 2014]

Цель исследования. Целью диссертационной работы является поиск и оценка потенциальной активности низкомолекулярных лигандов, направленной на ингибирование систем КС *P. aeruginosa*, с использованием инновационных многоцелевых стратегий с применением компьютерных вычислительных методов.

В связи с поставленной целью сформулированы следующие основные задачи:

1. Получение пространственных моделей третичных структур белков-мишеней и идентификация их сайтов связывания с низкомолекулярными лигандами.

2. Создание виртуальной библиотеки потенциальных ингибиторов - флавонов и их производных, связывающихся с системой КС бактерий *P. aeruginosa*.
3. Проведение *in silico* скрининга соединений из виртуальной библиотеки.
4. Проведение молекулярного докинга с использованием трех программных пакетов.
5. Создание и валидация нового метода обработки полученных данных на основе консенсусной оценки результатов докинга с целью повышения достоверности.
6. Оптимизация метода минимизации и расчета свободной энергии по методу ММ-GBSA/PBSA и его применение в качестве оценки рескоринга.
7. Проведение молекулярно-динамических симуляций для оценки стабильности во времени полученных комплексов лиганд-мишень.
8. Разработка антиинфекционной стратегии с использованием многоцелевого подхода для исследования и идентификации ключевых белков-мишеней, связанных с системами КС бактерий *P. aeruginosa*.
9. Структурный анализ отобранных соединений с потенциалом многоцелевого действия против системы QS бактерий *P. aeruginosa*.
10. Оценка фармакологических параметров лидирующих соединений по критериям ADMET.

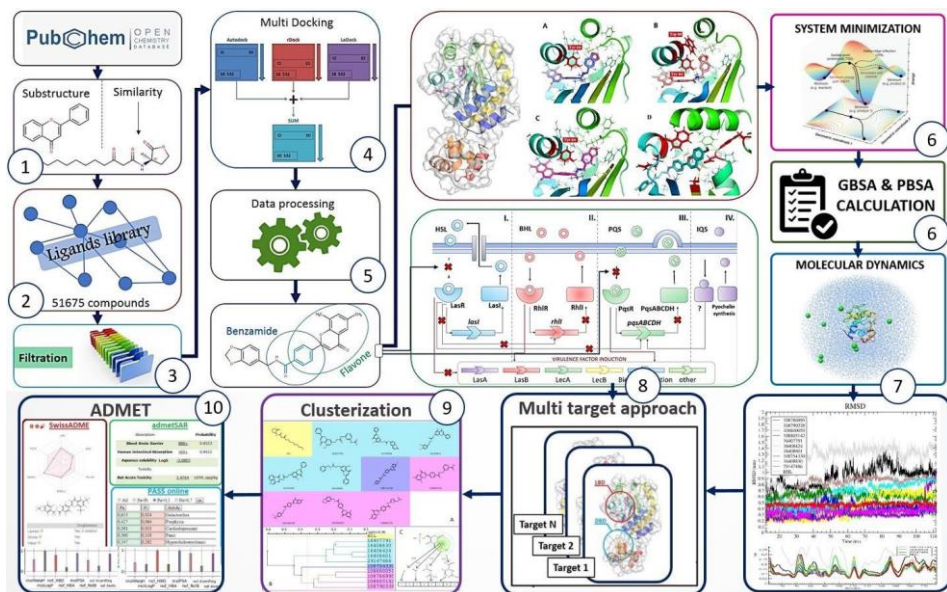


Рис. 1. (1) - Выбор критериев и структур для создания библиотеки потенциальных ингибиторов; (2) - Создание виртуальной библиотеки химических соединений; (3) - Предварительная фильтрация библиотеки соединений; (4) - Проведение молекулярного докинга с использованием трех программных пакетов; (5) - Создание и валидация нового метода обработки данных; (6) - Рескоринг по методу ММ-GBSA/PBSA; (7) - Молекулярно-динамическое моделирование; (8) - Использование многоцелевого подхода для оценки потенциала соединений; (9) - Структурный анализ химических соединений; (10) - Оценка фармакологических параметров и схожесть с лекарствами.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы. Впервые нами *in silico* идентифицированы потенциально сильные ингибиторы систем КС *P. aeruginosa* флавоновой природы с использованием комплексного набора вычислительных подходов для дизайна лекарств. Отобраны несколько соединений со структурами, отличающимися от природного автоиндуктора регулятора транскрипции первой основной системы КС LasR - N-(3-оксододеканол)-L-гомосерин лактона (OdDHL). Эти соединения содержали химические субструктуры (бензамид, индол, кумариновая группа, бензойная кислота). Наши результаты согласуются с литературными данными, где *in vivo* показано сильное антибактериальное действие аналогичных соединений и ингибирующее действие на системы QS *P. aeruginosa* и усиление антибиопленочной активности антибиотиков. Выбранные нами топ 10 соединений удовлетворяют критериям, предъявляемыми ADMET к лекарственным средствам, благодаря чему могут служить основой для разработки противoinфекционной терапии.

Получены пространственные модели третичных структур белков-мишеней и идентифицированы сайты их связывания с низкомолекулярными лигандами с использованием трех программных пакетов молекулярного докинга. Оптимизирован метод MM-GBSA/PBSA минимизации и расчета свободной энергии и его применение в качестве оценки рескоринга для получения более достоверных оценок.

В рамках многомишенной антиинфекционной стратегии нами показано, что отобранные соединения могут одновременно ингибировать первую и третью систему регуляторной сети системы КС *P. aeruginosa*.

Полученные в данной работе результаты открывают новые возможности дизайна соединений, потенциально используемых в антиинфекционной терапии. Полученные данные могут быть использованы в специальных лекционных курсах для студентов соответствующих кафедр ЕГУ, ЕГМУ, РАУ, а также в научных лабораториях по биофизике, молекулярной биологии и биоинформатике.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на международных и республиканских конференциях: 45-ом международном научном конгрессе FEBS (Любляна, Словения, 2021), 20-ом международном научном форуме молодых ученых (YSF FEBS) (Ловран, Хорватия, 2021), международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» и «Ломоносов-2020» (Россия, Москва, 2019, 2020), II всероссийской научно-практической конференции по внедрению научных разработок (Москва, Россия, 2017), международной научной конференции летней школы по биоинформатике (Москва, Россия, 2019), международной научной интернет-конференции «Биотехнология: Взгляд в будущее» (Россия, Ставрополь, 2018, 2020), международной научной конференции посвященной 70-летию СНО ЕГУ (Ереван, Армения, 2017), V международной научной конференции посвященной памяти Вардапетяна «Биотехнология и здоровье» (Ереван, Армения, 2020), также на годичных конференциях проводимых Российско-Армянским университетом (РАУ), семинарах и заседаниях кафедр «Медицинской биохимии и биотехнологии», «Биоинженерии, биоинформатики и молекулярной биологии» Института биомедицины и фармации РАУ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 работ (4 статьи и 7 тезиса).

Структура и объем диссертации. Работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, заключения, выводов, приложения и списка литературы, насчитывающего 126 наименований. Диссертация изложена на 102 страницах, содержит 5 таблиц и 34 рисунка.

## ВВЕДЕНИЕ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Во введении обосновывается актуальность темы исследования, представляются объект и предмет исследования, степень ее разработанности, формулируются цель и задачи, методологические подходы и новые разработки, обосновывается научная новизна, формулируются основные положения, выносимые на защиту, представляется теоретическая и практическая значимость исследования, апробация результатов исследования и структура работы.

В обзоре литературы приводятся: системы КС бактерий как мишени для антиинфекционной терапии, формирование микробных биопленок и последствия образования их, как частный случай рассматривается сигнальная сеть кворум сенсинга у одного из самых распространённых возбудителей внутрибольничных инфекций - *P. aeruginosa* и многоцелевые стратегии борьбы с ней. Обсуждаются антипатогенные активности флавонов и современные методы структурной биологии и биоинформатики в разработке лекарств.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на кафедре Биоинженерии, биоинформатики и молекулярной биологии, и кафедре Медицинской биохимии и биотехнологии РАУ, в научной группе ИКАР РАУ.

### Подготовка структур белков-мишеней и идентификация сайтов связывания

В качестве модели была взята впервые виртуально реконструированная полная структура рецептора LasR [Grabski et al. 2017]. Для обработки и анализа данных использовался язык программирования Python [Pedregosa et al. 2011] а также программные библиотеки Pybel [O'Boyle et al. 2008], Pandas [McKinney et al. 2012], Matplotlib 3.0.3 [Hunter et al. 2007]. Ранжировка конформации по энергии связывания осуществлялась с использованием цветовой карты Jet библиотеки Matplotlib 3.0.3. Сайты связывания белков были также проверены сервером MetaPocket [Huang et al. 2009].

Кристаллографические структуры белков LasI и MvfR взяты из базы данных PDB (1RO5, 6B8A). Из этих структур были удалены стабилизаторы, молекулы воды, а для атомов белка были рассчитаны частичные заряды.

### Подготовка библиотеки химических соединений

Для создания локальной библиотеки химических соединений использовалась бесплатная база данных PubChem, содержащих около 111 000 000 соединений [Pawson et al. 2014] (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Методом “Substructure” были отобраны флавоны и их производные в качестве исходной библиотеки для виртуального скрининга потенциальных ингибиторов регулятора транскрипции первой системы КС LasR *P. aeruginosa*. Далее, основываясь на правилах пяти Липинского [Lipinski 2004], были исключены те соединения, для которых были спрогнозированы или плохая абсорбция, или проникающая способность. Для удаления соединений, не имеющих химических производителей, был использован фильтр Chemical Vendors, что привело к сокращению числа соединений до 10532. Подготовка и оптимизация лигандов проводились на основе расчётов конформационной подвижности (определение степеней свободы), были вставлены полярные атомы водорода, а также рассчитаны заряды для всех атомов.

Обработка данных осуществлялась посредством программного пакета OpenBabel v2.4.0 [O'Boyle et al. 2011].

### Молекулярный докинг

Молекулярный докинг осуществлялся с использованием трех программных пакетов - AutoDock Vina, rDock и LeDock, которые демонстрировали высокую производительность в комплексной оценке программ докинга [Wang et al. 2016] и подхода консенсусной оценки, повышающей надежность результатов виртуального скрининга. Была разработана и оценена новая методика обработки данных с использованием нескольких программных пакетов [Chilingaryan, Abelyan et al. 2021].

### Рескоринг по методу MM-GBSA/PBSA

Метод более строгого расчета энергии связывания обычно требует много времени. Одним из таких методов расчета является рескоринг по методу MM-GBSA/PBSA. Данный метод применялся нами как промежуточный фильтр для переоценки результатов докинга [Abelyan et al. 2021].

### Симуляция молекулярной динамики

Это один из мощных вычислительных методов, который эффективно используется для моделирования физических и биологических систем [Frenkel & Smit 2001]. Методы молекулярной динамики (МД) позволяют рассчитать траектории отдельных атомов и полимерных цепей для изучения на молекулярном уровне с использованием классической механики [Allen et al. 2017, Stillinger et al. 1985]. Симуляцию МД можно ускорить с помощью графических процессоров. Это важно для запуска большего количества и более продолжительных симуляций для получения более качественных образцов.

### Оценка параметров соединений согласно критериям ADMET

Оценку параметров ADMET: абсорбции, фармакокинетики, метаболизма, преодоления гематоэнцефалического барьера, выведения из организма и токсичности проводили с помощью четырех программ - SwissADME [Daina et al. 2017], admetSAR [Cheng et al. 2012] и PASS online [Filimonov et al. 2014] и ICM molsoft [Abagyan et al. 1994], которые являются инструментами в драг-дизайне.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Отбор химических соединений из локальной библиотеки

Нами была создана локальная библиотека на основе субструктуры флавонов, как потенциальных ингибиторов первой системы КС *P. aeruginosa*. Эксперименты проводились на модели регуляторного белка LasR, полная структура которого впервые была реконструирована в группе ИКАР [Grabski et al. 2017]. Был проведен молекулярный докинг химических соединений из локальной библиотеки с двумя сайтами связывания основного белка регуляторной сети КС LasR с лиганд - (LBD) и ДНК связывающими доменами (DBD).

Важно отметить, что связывание нативного лиганда N-(3-оксододеcanoил)-L-гомосерин лактона (OdHSL) с LBD происходит с энергией равной -5.7 Ккал/моль. Полученные результаты свидетельствуют о том, что связывание исследованных флавоновых соединений происходит интенсивно как с LBD, так и с DBD. Однако большинство соединений проявляют более высокую аффинность к LBD, поэтому

дальнейшие исследования поиска потенциальных ингибиторов проводили именно с этим сайтом.

Так как программы докинга не являются совершенными, то для получения более достоверных результатов был проведен молекулярный докинг тех же соединений другими программами докинга, а именно rDock и LeDock. Структуры 10 отобранных соединений и OdHSL, которые получили высокие оценки (Score) по результатам консенсусной оценки (Табл.1) с использованием трех программ (AutoDock, rDock, LeDock) представлены на рисунке 2.

Табл. 1.

Соединения, получившие хорошие оценки всеми программами.

IUPAC Name	PubChem CID	Score
N-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-4-(6,8-dimethyl-4-oxochromen-2-yl)benzamide	108786995	253.59
N-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl]-2-(5-hydroxy-4-oxo-2-phenyl-chromen-7-yl)oxyacetamide	16408424	247.52
N-(3-acetamidophenyl)-2-(5-hydroxy-4-oxo-2-phenylchromen-7-yl)oxyacetamide	16407791	245.64
4-(6-methyl-4-oxochromen-2-yl)-N-[5-(2-methylpropyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]benzamide	108803142	244.50
4-(6-methyl-4-oxochromen-2-yl)-N-[2-(4-sulfamoylphenyl) ethyl]benzamide	108790338	243.01
2-(5-hydroxy-4-oxo-2-phenylchromen-7-yl)oxy-N-(2-oxochromen-6-yl)acetamide	16408830	240.92
(2S)-2-[[[2-(5-hydroxy-4-oxo-2-phenylchromen-7-yl)oxyacetyl]amino]-3-(1H-indol-3-yl)propanoic acid	29147486	240.28
3-[[[4-(6,8-dimethyl-4-oxochromen-2-yl)benzoyl]amino]methyl]benzoic acid	108800059	239.49
2-(5-hydroxy-4-oxo-2-phenylchromen-7-yl)oxy-N-(pyridin-3-ylmethyl)acetamide	16408601	239.03
N'-(4-fluorophenyl)-N-[4-(6-methoxy-4-oxochromen-2-yl)phenyl]butanediamide	108754330	237.89



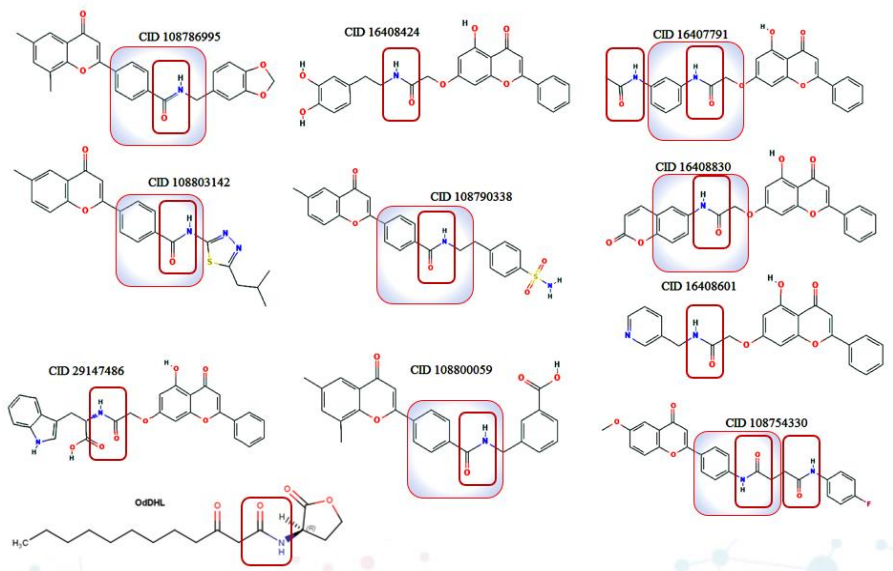


Рис. 2. Химические структуры 10 отобранных соединений и OdDHL.

### Потенциал взаимодействий отобранных соединений с ключевыми белками КС *P. aeruginosa*

В рамках многоцелевого подхода был проведен молекулярный докинг выбранных соединений систем КС *P. aeruginosa* LasI и MvfR. Докинг флавонов с синтазой автоиндуктора LasI показал, что все они взаимодействуют с LasI с меньшей аффинностью нежели с LasR. Согласно полученным результатам CID 16408601 и CID 108803142 получили наименьшие оценки связывания ( $E=183$ ). А самую высокую оценку ( $E=196$ ) получило соединение CID 108800059 (Табл. 2).

Соединения, показавшие высокую аффинность связывания с LasR и меньшую - с LasI, обладают большим потенциалом для рассмотрения их в качестве соединений, направленных на подавление инфекции *P. aeruginosa*. Нормальное функционирование синтазы LasI и одновременно нефункционирование LasR приводит к увеличению концентрации N-ацил-гомосеринлактона (AHL) в организме хозяина, что является хемоаттрактантом для лейкоцитов иммунной системы [Zimmermann et al. 2006, Karlsson et al. 2012] и повышает связывание и фагоцитарную активность в макрофагах [Holm et al. 2015]. Предполагается что такие соединения будут действовать как на молекулярном, так и на организменном уровне, активируя иммунный ответ хозяина и делая бактерии уязвимыми.

В рамках многоцелевого подхода был проведен также молекулярный докинг выбранных соединений с основным белком третьей системы КС - MvfR.

Табл.2.

Результаты Докинга отобранных соединений с LasI.

PubChem CID	Score
108786995	190
16408424	187
16407791	191
108803142	183
108790338	184
16408830	194
29147486	189
108800059	196
16408601	183
108754330	185

В то время как все системы КС *P. aeruginosa* необходимы для полной патогенности у млекопитающих-хозяев, путь lasR часто инактивируется в изолятах, полученных от пациентов с муковисцидозом, и таким образом, он может быть несущественным для хронической инфекции. Эта инактивация связана либо с мутациями самого LasR, либо может быть связана со специфическими функциями, регулируемые белком MvfR [Kesarwani et al 2011]. MvfR необходим для полной вирулентности. Он связывается и активирует оперон pqs, который кодирует ферменты для синтеза 4-гидрокси-2-алкилхинолины (HAQ), включая 3,4-дигидрокси-2-гептилхинолин (PQS) и 4-гидрокси-2-гептилхинолин (HHQ). Эти молекулы продуцируются в тканях человека и действуют патогенно. И HHQ, и PQS связываются с MvfR и активируют его, что приводит к продукции регулируемых MvfR факторов вирулентности, которые способствуют возникновению острых инфекций [Kitao et al. 2018].

Все отобранные нами соединения с высокой аффинностью взаимодействуют с сайтом связывания известного ингибитора MvfR - M64. Полученные данные свидетельствуют о возможном ингибирующем эффекте отобранных соединений на белок MvfR, что в свою очередь приводит к ингибированию третьей системы КС *P. aeruginosa*. Таким образом исследованные нами соединения могут потенциально ингибировать одновременно две системы КС (I и III). Консенсусные оценки результатов докинга отобранных флавонов и их производных с MvfR и LasR представлены в таблице 3.

Табл. 3.

Консенсусные оценки результатов докинга флавонов с MvfR и LasR.

<b>PubChem CID:</b>	<b>MvfR LBD (Score)</b>	<b>LasR LBD (Score)</b>
108786995	240	254
16408424	245	247
16407791	241	246
108803142	232	244
108790338	244	243
16408830	253	241
29147486	248	240
108800059	238	239
16408601	247	239
108754330	244	238
M64	232	-

#### Рескоринг по методу MM-GBSA/PBSA и МД симуляция

Комплексы лигандов, связанные с белком LasR, предсказанные различными программными пакетами, были минимизированы в обобщенных моделях неявного растворителя Борна. Последний ‘snapshot’ минимизированного комплекса используется для расчета свободной энергии методами более строгого расчета аффинности связывания MM-GBSA/PBSA (Табл. 4). Данный метод был апробирован и успешно применен в нашей недавней работе в качестве промежуточного фильтра для рескоринга результатов докинга [Abelyan et al. 2021].

Согласно полученным результатам минимизированные комплексы некоторых потенциальных ингибиторов проявляли большую аффинность связывания, нежели нативный лиганд OdDHL.

Табл. 4.

Оценки энергии связывания (Ккал/моль) белка LasR с выбранными соединениями для структур комплексов, полученных разными программами докинга.

<b>PubChem CID</b>	<b>Vina</b>	<b>rDock</b>	<b>LeDock</b>
OdDHL	-27.683	-27.683	-27.548
16407791	-16.196	-20.349	-14.730
16408424	-22.342	-27.778	-30.265

Таблица 4. (продолжение)			
16408601	-30.433	-33.634	-33.493
16408830	-31.062	-25.752	-30.329
29147486	-22.501	-16.710	-14.695
108754330	-24.633	-20.366	-22.609
108786995	-28.341	-20.153	-27.418
108790338	-22.755	-19.333	-20.964
108800059	-28.347	-21.127	-29.326
108803142	-26.554	-24.259	-23.030

Далее для каждого соединения была выбрана структура с наименьшей свободной энергией связывания с целью последующего проведения молекулярно-динамических симуляций, чтобы изучить стабильность полученных систем во времени и рассчитать их энергетические показатели. На основе полученных траекторий были рассчитаны среднеквадратичные отклонения (RMSD) для количественной оценки степени изменения позы связывания лиганда в ходе моделирования.

Согласно полученным результатам нативный лиганд LasR-a OdDHL остается в сайте связывания на протяжении всей молекулярно-динамической симуляции (100 нс) (Рис. 3).

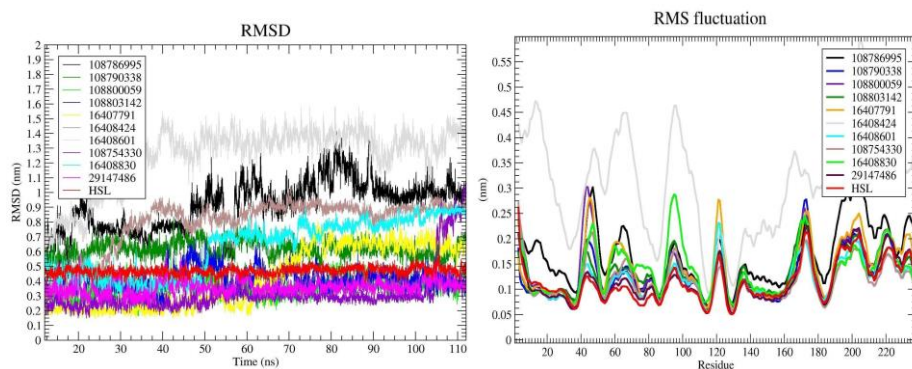


Рис. 3. Значения RMSD и RMSF исследуемых соединений в комплексе с LasR при 100 нс МД.

Среднеквадратичное отклонение конформации минимизированной и уравновешенной структуры лиганда относительно изначальной конформации докинга составляет 0.5 Å. Далее флуктуации RMSD остаются примерно в пределах 0.2 Å на протяжении 100 нс симуляции, что указывает на достаточно стабильную систему на протяжении всего моделирования. Согласно анализу траектории 10 отобранных нами соединений с сайтом связывания LBD белка LasR все выявленные соединения также остаются в сайте

связывания на протяжении всей молекулярной динамической симуляции (100 нс) (Рис. 3). Кроме того, был проведен анализ RMSF для измерения средней атомной флуктуации атомов Са комплексов и дополнительной оценки стабильности. Практически все комплексы за исключением (CID 16408424, CID108786995) продемонстрировали сходное среднее отклонение значений RMSF ( $<0,3$  нм). Общие результаты RMSD и RMSF показали, что при моделировании систем не произошло существенных/резких конформационных изменений, что указывает на относительную стабильность этих систем на протяжении всего моделирования.

Далее для всех отобранных соединений был проведен общий анализ энергетических показателей на протяжении 100 нс МД симуляции, рассчитанных методом ММ-PBSA на основании 500 “snapshot”. Данные представлены на рисунке 4.

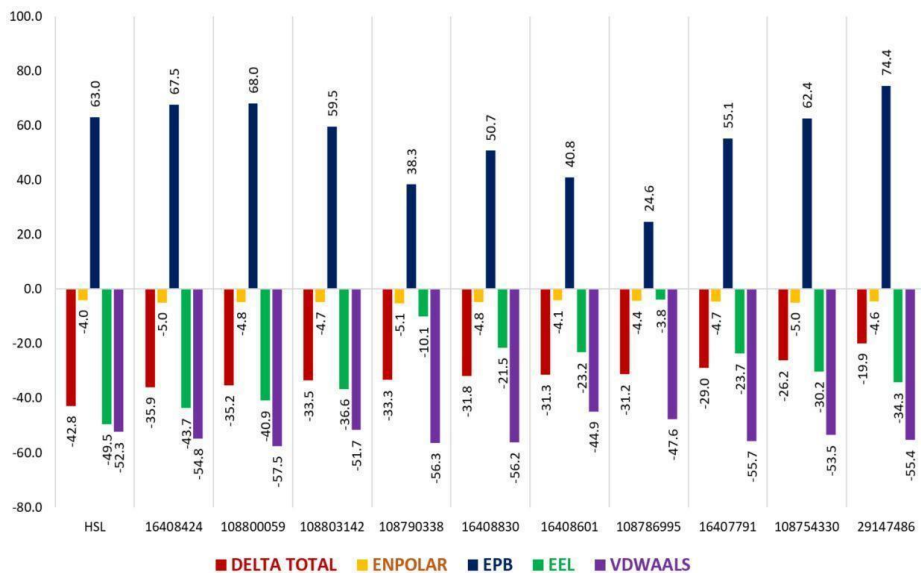


Рис. 4. Средняя энергия связывания соединений с LasR на протяжении 100 нс симуляции МД

Несмотря на то, что средняя энергия связывания на протяжении 100 нс симуляции ни одного из соединений не превосходит энергию нативного лиганда, большинство из них всё-таки проявляют близкие к ней значения. Учитывая тот факт, что все отобранные “Hit” соединения являются производными природных флавонов, то эти химические субструктуры могут стать отправной точкой для дальнейшей модификации и улучшения энергетических показателей на следующих этапах от “Hit” в “Lead” в процессе разработки драг-дизайна.

### Субструктуры отобранных соединений как потенциальных ингибиторов систем КС

В структуре нативного лиганда OdDHL есть амидная связь [-CO-NH-], ответственная за связывание с Asp73 и Tyr56 LBD LasR. Такая же химическая связь присутствует в некоторых уже известных соединениях, взаимодействующих с LasR [O'Loughlin et al. 2013, Smith et al 2003, Starkey et al. 2014]. Примечательно, что во всех 10 отобранных нами соединениях присутствовала такая же амидная связь. Это может говорить о сопоставимости полученных результатов и важности этой связи в структуре соединений, обеспечивающих сильное взаимодействие с LBD LasR.

Выбранные нами лидирующие соединения имеют некоторое структурное сходство с соединениями, для которых уже выявлен ингибирующий эффект на систему lasR/lasI:

- Из 10 - ти соединений в 7-ми встречается бензамидная группа. В трех из них бензольное кольцо связано с атомом азота аминогруппы (CID 16407791, CID 16408830, CID 108754330) а в четырех - с углеродом карбонильной группы (CID 108786995, CID 108803142, CID 108790338, CID 108800059). Согласно литературным экспериментальным данным соединения, содержащие бензамидную группу, обладали антивирулентными свойствами в *in vitro/in vivo* моделях. В работе [Yang L et al. 2009] выявлено соединение, содержащее бензамидную группу – Нифуроксазид, которое проявляло ингибирующее действие на КС, непосредственно взаимодействуя с белком LasR. Также были обнаружены трифенилмимики HSL-а, взаимодействующие с LasR, содержащие бензамидную группу [Müh et al. 2006]. В работе [Starkey et al. 2014] в результате скрининга был выявлен ряд соединений с бензамидной группой, обладающих антивирулентными свойствами. Эти соединения снижали продукцию HAQ, которая продуцируется системой PqsR. Наиболее сильные ингибиторы (M51, M34, M62, M50 и M64) не ингибировали белки, экспрессируемые генами pqsABCD и участвующие в непосредственном синтезе HAQ, что позволяет предположить, что эти ингибиторы нацелены на MvfR или другой восходящий регуляторный компонент. Для соединения M64 показано взаимодействие с MvfR что, может привести к снижению продукции HAQ. Но следует отметить, что снижение продукции HAQ и активация каскада системы PqsR (MvfR) происходит также через систему LasI/LasR. И поскольку в большинстве выявленных нами потенциальных кандидатов, ингибирующих LasR, есть бензамидная группа, то можно предположить, что для остальных соединений снижение продукции HAQ было обусловлено скорее всего ингибированием системы LasR/LasI. Согласно статье [Yang et al. 2009], выявленные 3 анти-вирулентных соединения, включая Нифуроксазид, кроме непосредственного ингибирования LasR обладали также непосредственно ингибирующим действием на системы КС Rhl и PqsR *P. aeruginosa*.
- CID 29147486 содержит бензол, связанный с пиролом (индол). Такая же химическая структура встречается и у indol-AHL (7h). Это соединение ингибирует белок LasR [Geske et al. 2005].
- CID 108800059 содержит структуру бензойной кислоты, которая входит в состав салициловой кислоты, которая также обладает ингибирующим действием на LasR [Yang et al. 2009].
- CID 16408830 содержит кумариновую группу (Coumarin(1,2-Benzopyrone) Согласно исследованиям, кумарин обладает антибиопленочной активностью против оппортунистического патогена человека *P. aeruginosa* [D'Almeida et al. 2017].

### Оценка фармакологических параметров лидирующих соединений (ADMET)

Оценка фармакологических параметров лидирующих соединений показала, что все выявленные соединения удовлетворяли правилу пяти Липинского, однако, для количественной оценки был рассчитан параметр Quantitative Estimate of Drug-likeness (QED). Согласно полученным результатам все 10 соединений проявляли приемлемые показатели ADMET и удовлетворяли критериям сходства с лекарственными препаратами

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для поиска, идентификации и исследования взаимодействия низкомолекулярных соединений с некоторыми ключевыми белками регуляторной сети КС *P. aeruginosa* была разработана оптимизированная методология, включающая ряд принятых, а также оригинальных, разработанных и оптимизированных нами, биоинформационных методов [Abelyan et al. 2021, Chilingaryan, Abelyan et al. 2021].

Проведенные нами симуляции молекулярного докинга исследуемых соединений с основным регулятором транскрипции первой системы КС *P. aeruginosa* LasR, продемонстрировали два потенциальных сайта связывания LBD и DBD, что совпадает с данными работ [Grabski et al. 2017]. При анализе данных оказалось, что флавоны и их производные интенсивно взаимодействуют как с LBD, так и с DBD. Однако большинство из них связываются с LBD с более высокой аффинностью, чем с DBD [Abelyan et al. 2020]. Отобранные нами в результате скрининга соединения содержат химические субструктуры (бензамид, индол, кумариновая группа, бензойная кислота), которые согласно известным экспериментальным данным, обладают ингибирующим действием на систему КС *P. aeruginosa* [Geske et al., 2005, D'Almeida et al. 2017, Yang et al. 2009]. Сравнительный анализ взаимодействия выявленных соединений с нативным аутоиндуктором LasR OdDHL показал наличие соединений, которые связывались с теми же консервативными аминокислотами из LBD LasR, что и нативный лиганд. Это указывает на возможность конкурентного взаимодействия этих соединений. Был также обнаружен ряд соединений, которые связываются с другими консервативными аминокислотами из LBD, что будет представлять интерес для дальнейшего изучения. При исследовании стабильности полученных комплексов во времени были проведены молекулярно динамические симуляции. Общие результаты этих симуляций показали, что все выявленные соединения, так же, как и OdDHL, остаются в сайте связывания LBD LasR. Согласно значениям RMSD и RMSF при моделировании систем не происходило существенных конформационных изменений, что указывает на относительную стабильность этих систем на протяжении всего моделирования. Выбранные соединения также проявляли хорошие энергетические показатели, близкие к таковым нативного аутоиндуктора OdDHL.

В рамках многоцелевой стратегии также было исследовано взаимодействие отобранных соединений с белками первой системы КС LasI и третьей системы КС *P. aeruginosa* - MvfR. Согласно результатам, все выявленные нами соединения имели больший потенциал связывания с белком LasR, нежели с LasI. А это очень важно, т.к. соединения с более высокой аффинностью связывания с LasR и меньшей - с LasI, обладают большим потенциалом действия согласно литературным данным, т.к. могут дополнительно активировать иммунный ответ хозяина и делать бактерии уязвимыми [Zimmermann et al. 2006, Karlsson et al. 2012, Holm et al. 2015].

В то время как все системы КС *P. aeruginosa* необходимы для проявления полной патогенности у млекопитающих - хозяев, путь lasR часто инактивируется в изолятах, полученных от пациентов с муковисцидозом, и таким образом, он может быть

несущественным при хронической инфекции. Эта инактивация связана с мутациями самого LasR или может быть связана со специфическими функциями, регулируемые MvfR [Kesarwani M. et al, 2011]. Поэтому нами было исследовано взаимодействие отобранных соединений с основным белком третьей системы QS *P. aeruginosa*- MvfR. Результаты молекулярного докинга показали, что все выявленные нами соединения также с высокой аффинностью взаимодействуют с LBD этого белка, а конкретно - с сайтом связывания основного ингибитора MvfR - M64. Это свидетельствует о возможном ингибирующем эффекте отобранных соединений на белок MvfR, что в свою очередь приведет к ингибированию третьей системы КС. В конечном итоге выявленные нами соединения в дальнейшем могут потенциально ингибировать одновременно две системы КС (I, III).

Для отобранных десяти лидирующих соединений были рассчитаны физико-химические показатели и предсказаны параметры ADMET несколькими программными пакетами. Согласно прогнозам, все они проявляют приемлемые показатели ADMET и удовлетворяют критериям сходства с лекарственными средствами. Выявленные соединения соответствуют критериям, необходимым для дальнейшего их рассмотрения в качестве потенциальных лекарственных средств, и могут служить основой для проведения дальнейших экспериментов *in vitro/in vivo*, с целью разработки современной противoinфекционной терапии на основе системы КС *P. aeruginosa*.

## ВЫВОДЫ

1. Большинство флавонов и их производных из локальной библиотеки взаимодействуют с LBD ключевого белка системы КС LasR с более высокой аффинностью связывания, чем с DBD, что показано несколькими программными пакетами докинга.
2. Среди выбранных соединений были обнаружены соединения, которые связываются с теми же консервативными аминокислотными остатками LBD LasR, что и OdDHL, что указывает на возможность их конкурентного взаимодействия. Был также обнаружен ряд соединений, которые связываются с другими консервативными аминокислотами из LBD LasR.
3. В топ 10 соединениях присутствует амидная связь, которая встречается как в структуре нативного автоиндуктора (OdDHL), так и в структурах уже известных ингибиторов LasR, что может свидетельствовать о важности этой связи, обеспечивающих сильное взаимодействие с LBD.
4. Отобранные нами соединения содержат химические субструктуры, такие как бензамид, индол, кумариновая группа, бензойная кислота, которые обладают ингибирующим действием на систему КС *P. aeruginosa*.
5. Выбранные нами соединения имеют потенциал одновременно ингибировать первую и третью систему регуляторной сети КС *P. aeruginosa*. Они с высокой аффинностью взаимодействуют как с LBD регулятора транскрипции LasR первой системы, так и с MvfR третьей системы.
6. Выбранные нами соединения также имеют потенциал активировать иммунную систему хозяина поскольку с меньшей аффинностью связываются с синтазой первой системы КС OdDHL - белком LasI, чем с LasR.
7. Топ 10 соединения проявляют приемлемые показатели ADMET и соответствуют критериям, необходимым для их рассмотрения в качестве потенциальных



лекарственных средств, и в дальнейших могут служить основой для разработки современной противомикробной терапии на основе систем КС *P. aeruginosa*.

#### СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. **Abelyan, N.**, Grabski, H., Tiratsuyan, S. (2020) *In silico* Screening of Flavones and its Derivatives as Potential Inhibitors of Quorum-Sensing Regulator LasR of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Biology*, 54(1), 134- 143. DOI: [10.1134/S0026893320010021](https://doi.org/10.1134/S0026893320010021)
2. Chilingaryan, G., **Abelyan, N.**, Sargsyan, A. *et al.* (2021) Combination of consensus and ensemble docking strategies for the discovery of human dihydroorotate dehydrogenase inhibitors. *Nature Scientific Reports* 11, 11417. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91069-7>
3. **Абелян Н.** (2019) Виртуальный скрининг флавонов и их производных как ингибиторов регулятора транскрипции LASR синегнойной палочки. *Вестник РАУ (физико-математические и естественные науки)*, 1, 110-120.
4. **Абелян Н. Н.**, Грабский О. В., Тирацуйан С.Г. (2018) Виртуальный скрининг потенциальных ингибиторов кворум-сенсинга антибиотикорезистентного оппортунистического патогена *Pseudomonas aeruginosa*. Сборник IV международной конференции “Биотехнология взгляд в будущее 2018”, 6-9.
5. **Abelyan, N.**, Grabski, H., Tiratsuyan, S. (2021). *In silico* screening of flavones and its derivatives as potential inhibitors of quorum-sensing regulator LasR of *Pseudomonas aeruginosa*. In *FEBS OPEN BIO*, 11, p. 101, DOI: 10.1002/2211-5463.13205
6. **Abelyan N.**, Chilingaryan G., Farsiyan L., Hovhannisyan A., Tiratsuyan S. (2020). Computational Modeling of Potential Inhibitors of the QS System of Antibiotic-Resistant Bacteria *P. aeruginosa*, V International Conference of Biotechnology and Health. Book of Abstracts. Organized by: Russian-Armenian University Yerevan, Armenia October 29–31, p. 15-16. ISBN 978-9939-67-254-0
7. **Абелян Н.Н.**, Тирацуйан С.Г. (2020). Молекулярное моделирование взаимодействия потенциальных ингибиторов регулятора кворум-сенсинга LasR бактерии *Pseudomonas aeruginosa*. *Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2020»*. ISBN 978-5-317-06417-4
8. **Абелян Н.**, Тирацуйан С. (2019). *In silico* скрининг низкомолекулярных ингибиторов кворум-сенсинга антибиотико-резистентной бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, активирующих иммунный ответ хозяина. XXVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» 2019. ISBN 978-5-317-06100-5
9. Ghrejjan E., Ohanyan S., **Abelyan N.**, Hovhannisyan A. (2020). Assessment of Sensitivity of AgNPs-Resistant *E. coli* to Antibiotics and Antibiotic-Nanoparticle Complexes, V International Conference of Biotechnology and Health. Book of Abstracts. Organized by: Russian-Armenian University Yerevan, Armenia October 29–31, p. 59-60, ISBN 978-9939-67-254-0

10. **Абелян Н.**, Тирацуйан С. (2019). *In silico* скрининг низкомолекулярных ингибиторов кворумсенсинга антибиотикорезистентной бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, активирующих иммунный ответ хозяина. Сборник докладов конференции Летней школы по биоинформатике. Москва 2019, 29 июля – 3 августа, стр. 4
11. **N.N. Abelyan**, G.R. Vardapetyan, S. G. Tiratsuyan, et al. (2017). Virtual screening of flavones and their derivatives to inhibit the LasR transcriptional regulator *Pseudomonas aeruginosa*. The second all-Russian practical conference on the implementation of scientific developments (Collection of reports), Moscow, Russia, October 25-26, 2017, p. 43;

## ՆԱԲԵԿ ՆՎԵՐԻ ԱԲԵԼՅԱՆ

*Pseudomonas aeruginosa* ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ԲՎՈՐՈՒՄ-ՍԵՆՍԻՒՆԳԻ ՀԱՍՎԱԿԱՐԳԵՐԻ  
ՊՈՏԵՆՑԻԱԼ ԱՐԳԵԼԱԿԻՉՆԵՐԻ ՈՐՈՆՈՒՄԸ

### ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

**Բանալի բառեր`** *P. aeruginosa*, քվորում-սենսինգ, կենսաթաղանթներ, LasR, LasI, MvfR, վիրտուալ սքրինինգ, մոլեկուլային դոքինգ, մոլեկուլային դինամիկայի սիմուլյացիա:

Հակաբիոտիկների նկատմամբ մանրէների կայունությունը մարդկության առաջ ծառայած գլոբալ խնդիրներից է: Ըստ կանխատեսումների` մինչև 2050 թվականը կայուն վարակներից մահացության թիվը կհասնի 10 միլիոնի, ինչը գերազանցում է այն մարդկանց թվին, որոնք ներկայումս մահանում են քաղցկեղից: Առողջապահության Համաշխարհային Կազմակերպությունը (ԱՀԿ) հրապարակել է մանրէների ցանկ, որը գլխավորում է հակաբիոտիկների նկատմամբ կայունություն ունեցող *Pseudomonas aeruginosa*-ն: Այս մանրէները առաջացնում են կենսաթաղանթներ, որտեղ արտազատում են բջջային հադորդակցության ազդանշանային մոլեկուլներ: Հասնելով շատ մեծ քանակի, նրանք սկսում են զգալ պոպուլյացիայի խտությունը, ինչը կոչվում է քվորում սենսինգ (ՔՍ): Կենսաթաղանթներում մանրէները պաշտպանված են արտաքին գործոններից, վնասակար նյութերի ներթափանցումից (ներառյալ հակաբիոտիկները): Քվորում սենսինգի շնորհիվ նրանցում արտահայտվում են պաթոգենության բազմաթիվ գեներ, այդ թվում` նաև հակաբիոտիկների նկատմամբ կայունության գեները: Ներկայումս հակաբիոտիկ դիմադրողականության աճի ու նրան դիմակայելու գործում կարևորվում է մշակել վարակներից պաշտպանվելու և բուժվելու նոր ռազմավարություններ, որոնք պետք է կենտրոնացնել բակտերիալ վիրուլենտության հիմնական գործոնների` հադորդակցման համակարգերի` ՔՍ-ի դեմ:

Ատենախտության նպատակն է որոնել և զնահատել ցածրամոլեկուլային լիզանդների պոտենցիալ արգելակիչ ակտիվությունը, ուղղված *P. aeruginosa* մանրէների ՔՍ համակարգերի վրա, օգտագործելով ժամանակակից բազմաթիրախային ռազմավարություն, կառուցվածքային կենսաինֆորմատիկայի, համակարգչային մոդելավորման և հաշվողական կենսաբանության մեթոդները:

Այդ նպատակով մեր կողմից նախագծվել և օպտիմալացվել են համակարգչային հետազոտության մի շարք մեթոդներ` ցածրամոլեկուլային միացությունների առավել արդյունավետ որոնման, նրանց կենսաբանական ակտիվության գնահատման և փոխազդեցությունների վերլուծության համար: Օգտագործելով մոլեկուլային դոկինգ ծրագրային երեք փաթեթներ` նույնականացվել են այդ մանրէների ՔՍ համակարգերի առանցքային սպիտակուցների հետ ցածրամոլեկուլային լիզանդների (ֆլավոնային միացությունների և դրանց ածանցյալների) կապման կայքերը: Ցույց է տրվել, որ ուսումնասիրված միացությունները ինտենսիվ փոխազդում են *P. aeruginosa* ՔՍ-ի առաջին համակարգի հիմնական սպիտակուցի` LasR-ի երկու կայքերի հետ` LBD և DBD: Սակայն նրանցից շատերը փոխազդում են LBD-ի հետ, ցուցադրելով կապման էներգիայի ավելի ցածր արժեք, քան DBD-ի հետ: Ստացված կոմպլեկսները մինիմիզացնելու և փոխազդեցության ազատ էներգիայի հաշվարկման նպատակով օպտիմալացվել և կիրառվել է MM-GBSA/PBSA մինիմիզացիայի մեթոդը: Ընտրված միացությունները ցույց են տվել OdDHL-ի ազատ կապման էներգիային մոտ արժեքներ: Մոլեկուլային դինամիկայի սիմուլյացիայի սմբողջ ընթացքում հետազոտվող

միացությունները գտնվել են LBD-ում: Հիմնվելով RMSD և RMSF ցուցանիշների վրա, կարելի է փաստել, որ մոդելավորման ընթացքում ուսումնասիրվող համակարգերի զգալի կոնֆորմացիոն փոփոխություններ չեն եղել և նրանք հարաբերական կայունություն են դրսևորել սիմուլյացիայի ամբողջ ընթացքում:

Ընտրված 10 միացությունները պարունակում են ենթակառուցվածքներ՝ բենզամիդային, ինդոլային, կումարինային, բենզոյաթթվային, որոնք ըստ գրական փորձարարական տվյալների նույնպես արգելակող ազդեցություն ունեն *P. aeruginosa*-ի ԲՄ-ի համակարգերի LasR սպիտակուցի վրա:

Որպես բազմաթիրախային ռազմավարության մաս, ուսումնասիրվել է նաև ընտրված միացությունների փոխազդեցությունը *P. aeruginosa*-ի ԲՄ-ի առաջին համակարգի մեկ այլ կարևոր սպիտակուցի՝ LasI-ի հետ: Ստացված արդյունքների համաձայն բոլոր միացությունները LasR-ի հետ կապվելու ավելի մեծ ներուժ ունեն, քան LasI-ի հետ: Սա կարևորվում է նրանով, որ ըստ գրականության տվյալների այդպիսի միացությունները կարող են նաև ակտիվացնել մարդու օրգանիզմի իմունային պատասխանը բակտերիաների նկատմամբ: Հաջորդիվ ուսումնասիրվել է ընտրված միացությունների փոխազդեցությունը ԲՄ-ի III համակարգի հիմնական սպիտակուց՝ MvfR-ի LBD-ի հետ: Մոլեկուլային դոկինգի արդյունքները ցույց են տվել, որ այդ միացությունները ունեն հնարավոր արգելակող ազդեցություն MvfR սպիտակուցի վրա, որն իր հերթին կհանգեցնի *P. aeruginosa*-ի ԲՄ-ի III համակարգի արգելակմանը: Այսպիսով, բոլոր ընտրված միացությունները պոտենցիալ կարող են միաժամանակ արգելակել *P. aeruginosa*-ի ԲՄ-ի I և III համակարգերը:

Ընտրված տասը միացությունների համար հաշվարկվել են նրանց ֆիզիկաքիմիական հատկանիշները, ինչպես նաև կանխատեսվել են ADMET պարամետրերը մի քանի ծրագրային փաթեթներով: Համաձայն ստացված տվյալների, այդ միացությունները համապատասխանում են այն չափանիշներին, որոնք անհրաժեշտ են դրանց հետագա դիտարկման համար որպես պոտենցիալ դեղամիջոցներ և կարող են հիմք հանդիսանալ *P. aeruginosa* մանրէների ԲՄ-ի համակարգի վրա հիմնված ժամանակակից հակավարակային թերապիա մշակելու համար:

DISCOVERY OF POTENTIAL INHIBITORS OF THE QUORUM SENSING SYSTEM OF  
*Pseudomonas aeruginosa*

SUMMARY

**Key words:** *P. aeruginosa*, quorum sensing, biofilms, LasR, LasI, MvfR, virtual screening, molecular docking, molecular dynamics simulations.

The resistance of the bacteria to antimicrobial drugs is an extremely urgent global healthcare issue. The number of annual deaths from chronic infections is expected to reach 10 million by 2050, which in comparison is higher than the current number of people dying from cancer. The World Health Organization (WHO) published the list of the most deadly infectious pathogenic bacteria, which is led by antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa*. These bacteria form biofilms and start to secrete cellular signaling molecules. When a very large number of signaling molecules are secreted, the cells begin to feel the density of the population through a system called quorum sensing (QS). Biofilms of the bacteria protect them from a variety of external factors, including penetration of harmful substances (including antibiotics). New strategies to treat infections and decrease antibiotic resistance are currently being developed, with focus on the main factors of bacterial virulence, such as the QS communication system.

The main goal of the thesis was to investigate and evaluate the potential of the selected low molecular weight ligands' inhibitory activity targeting the QS system of *P. aeruginosa* using modern computational tools and development of multi-target strategy.

For that purpose, a number of computational methods for virtual screening of small molecules, assessment of their biological activity and analysis of their interactions was developed and optimized. The binding sites of selected small molecules (flavonoids and their derivatives) on the key proteins of the quorum sensing systems of these bacteria were identified and verified using three different software packages for molecular docking. Studied compounds demonstrated potentially strong interaction with the two major domains (LBD and DBD) of the key protein of *P. aeruginosa*'s QS system - LasR. Generally studied compounds demonstrated higher binding affinity towards the LBD domain of the protein in comparison to DBD. Original MM-GBSA/PBSA methodology, optimized for the purposes of this work, was used to minimization and binding free energy calculations of the studied complexes. Identified compounds demonstrated similar to the OdDHL binding affinity to the LasR protein. Based on the RMSD and RMSF values of the performed molecular dynamics simulations selected compounds demonstrated stable interaction with the LBD domain of LasR protein throughout the duration of simulations.

The selected 10 compounds contain chemical substructures, such as benzamide, indole, coumarin, benzoic acid, that are known from the literary experimental data to have an inhibitory effect on the QS systems of *P. aeruginosa*.

As part of the multi-target strategy, the interaction of selected compounds with another potent protein of *P. aeruginosa*'s QS system - LasI, was also studied. According to the results, all compounds showed stronger potential to bind to LasR than to LasI, which according to the existing experimental literature has significant importance with regards to the potency of compounds to activate and increase antimicrobial immune response. At the next stage, potential of the selected compounds to interact with the LBD domain of the key protein of QS system III

- MvfR was evaluated. The results of molecular docking have shown that these compounds have a potential inhibitory effect on the MvfR protein, which in turn leads to inhibition of the *P. aeruginosa*'s QS III system. Thus, all selected compounds can potentially inhibit *P. aeruginosa*'s QS I and III systems simultaneously.

The physicochemical properties, as well as the ADMET parameters, of the top 10 selected compounds were calculated and validated using several software packages. According to the obtained results, identified compounds meet the required criteria for their consideration as potential drug-like compounds and are of great value for the development of modern anti-infective therapy based on the QS system of *P. aeruginosa* bacteria.

