

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕТЕРОДИМЕРА UxuR-ExuR С КОМПОНЕНТАМИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПУТИ УТИЛИЗАЦИИ ГЕКСУРОНАТОВ В *Escherichia coli*

© 2021 г. Ю.А. Пуртов\*, \*\*, С.В. Тищенко\*, А.Д. Никулин\*

\*Институт белка РАН, 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 4

\*\*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: yapurto@yahoo.com

Поступила в редакцию 27.04.2021 г.

После доработки 27.05.2021 г.

Принята к публикации 28.05.2021 г.

Фактор транскрипции UxuR является репрессором ряда генов катаболизма гексуронатов. Он может образовывать гетеродимеры со своим паралогом ExuR, что в присутствии глюкуроната ведет к активации репрессируемых UxuR генов. Ранее методом гибкого последовательного молекулярного докинга было предсказано, что сахара связываются с междоменными линкерами UxuR и ExuR, влияя на взаимное расположение доменов белков. Аналогичные расчеты на моделях гетеродимера UxuR-ExuR, соответствующих четырем точкам его молекулярно-динамической симуляции, тоже предсказывают связывание сахаров с междоменными линкерами. Изменения в конформации белка модулируют место и степень аффинности такого взаимодействия. Выдвигается гипотеза о появлении более стабильных комплексов UxuR-ExuR-глюкуронат с повышенной аффинностью связывания с некоторыми конформациями междоменных линкеров белков. Это уменьшает число свободных мономеров, а значит, и гомодимеров UxuR в присутствии этих сахаров, и снижает репрессию UxuR его регулона.

*Ключевые слова:* гетеродимер UxuR-ExuR, регуляция транскрипции, гексуронаты, гибкий молекулярный докинг, конформационные изменения белка.

DOI: 10.31857/S0006302921050070

Основным способом реакции прокариот на внешние трофические стимулы является избирательное модулирование транскрипционной активности соответствующих генов. Ферменты, вовлекаемые в метаболические пути, как правило, организованы в опероны и находятся под общим контролем транскрипционных факторов, зачастую чувствительных к компонентам контролируемых метаболических путей.

Необходимость связывания с низкомолекулярным лигандом, который является субстратом либо продуктом регулируемых ферментативных реакций, показана для многих белков-регуляторов транскрипции. Для некоторых транскрипционных факторов механизм активации при связывании с лигандом хорошо изучен и считается общим в пределах как минимум семейства этих факторов. Как правило, при взаимодействии с лигандом индуцируются изменения в конформации белка.

Представитель GntR-семейства транскрипционных факторов белок NagR из *Bacillus subtilis*

контролирует метаболизм N-ацетилглюкозамина [1], который связывается с С-концевым доменом белка, приводя к изменению конформации междоменного линкера, что, в свою очередь, влияет на ДНК-связывающие свойства NagR. При взаимодействии представителя ROK-семейства глюкокиназы SgGlcA из *Streptomyces griseus* с глюкозой [2] происходят структурные изменения в междоменном участке С-концевого домена белка, в результате которых SgGlcA взаимодействует с ДНК. Аналогичная схема активации регуляторов транскрипции наблюдается в LacI/GalR-семействе, классическим представителем которого является регулятор лактозного оперона [3]. У белков-регуляторов этого семейства функционально важны два структурно подвижных участка. В линкере между ДНК- и эффекторсвязывающими доменами возможно образование спирального участка «hinge helix», необходимого для специфического узнавания ДНК [4–7]. Между N- и С-концевыми субдоменами С-концевого домена, который является мишенью для связывания с мо-

лекулами-эффекторами, также возможно образование «шарнира», что приводит к переориентации N-концевого субдомена C-концевого домена и смещению «hinge helix» и N-концевого домена в позицию, которая способствует связыванию с ДНК.

Таким образом, подвижные малоструктурированные участки белка являются удобной мишенью для взаимодействия с молекулами-эффектора и через изменение конформации таких участков часто происходит модулирование активности содержащих их транскрипционных факторов.

Транскрипционный репрессор UxuR и его паралог ExuR (совпадение последовательности 45%) контролируют транскрипцию генов ключевых ферментов пути Эшвелла, в ходе которого гексуронаты и гексуруновые кислоты адаптируются для включения в цикл гликолиза [8–10]. Оба этих двухдоменных белка относятся к GntR-семейству транскрипционных факторов [10, 11] и функционально активны в форме димеров. N-концевой ДНК-связывающий домен имеет типичный wHtH-мотив [12], C-концевой эффекторсвязывающий димеризационный домен более разнороден по структуре. В зависимости от структуры C-домена выделяют семь подсемейств, различающихся количеством альфа-спиралей и наличием/количеством бета-слоев [13]. Белки UxuR и ExuR относятся к FadR-подсемейству GntR-семейства транскрипционных факторов.

Поскольку интермедиаты путей Эшвелла и Энтнера–Дудорова могут влиять на взаимодействие UxuR с ДНК [14], методом молекулярного докинга была изучена возможность образования комплексов мономерных форм этих белков с различными сахарами [15]. Были предсказаны места взаимодействия лигандов (сахаров, молекул-эффекторов) с белками, найдены два участка на молекуле UxuR и один – на ExuR. Оба белка связывали лиганды на поверхности междоменного линкера, причем общая область связывания занимала участок больший, чем необходим для связывания одного лиганда, а значения аффинности лигандов не предполагали явной предпочтительности какого-либо лиганда перед другими. Второй сайт взаимодействия UxuR с лигандом (наиболее вероятные кандидаты – D-фруктуронат, D-галактуронат и D-глюкуронат) располагался между альфа-спиралями C-концевого домена [16]. Аналогичные результаты по взаимодействию UxuR с лигандами были получены для димерной формы белка [17]. Как и в случае мономера белка, наблюдались два места связывания лигандов. Один располагался на поверхности, формируемой междоменными линкерами димера и, частично, первой альфа-спиралью N-концевого домена, второй – в кармане внутри C-концевого домена. Второй сайт в димерной форме белка,

так же как и в мономерной, был доступен D-фруктуронату, D-галактуронату и D-глюкуронату. Предполагается, что проникновение лигандов внутрь C-концевого домена белка провоцирует реорганизацию расположения альфа-спиралей домена и, как следствие, влияет на ориентацию междоменного линкера и ориентацию N-концевого домена относительно C-концевого.

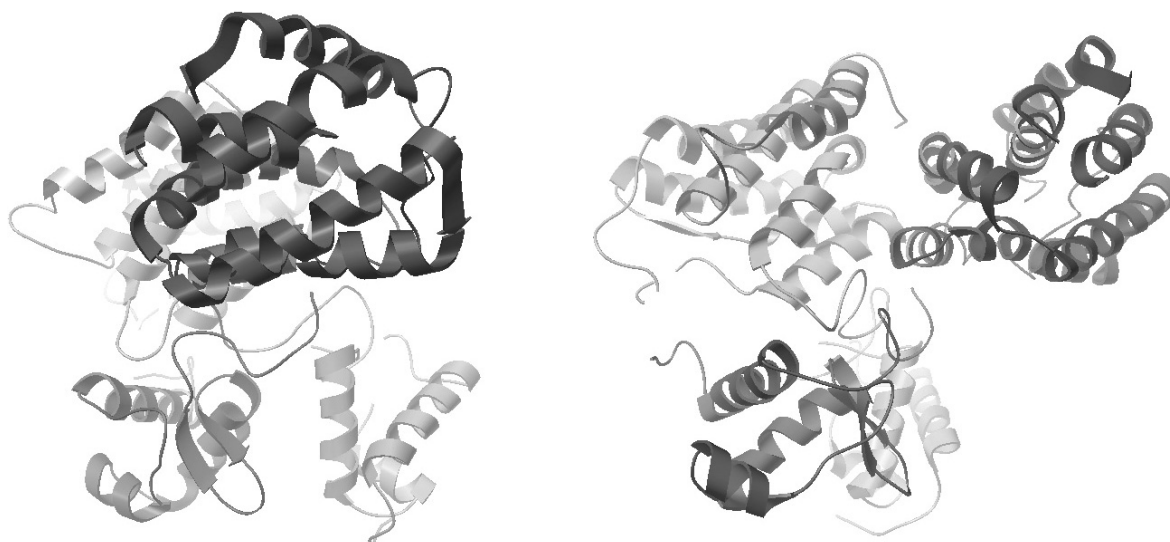
В присутствии глюкуроната UxuR и ExuR способны образовывать гетеродимер [16], в результате чего происходит активация репрессируемых UxuR генов. Таким образом, ExuR может считаться фактором, снимающим в присутствии глюкуроната репрессорный эффект белка UxuR, что объясняет запуск бактериями процесса утилизации гексуронатов при их наличии в среде. Неясно, однако, какие структурные факторы делают более предпочтительным образование комплекса «UxuR–ExuR–гексуронат(глюкуронат)», чем комплексов гомодимерных форм этих белков с сахарами. Одним из путей исследования этого вопроса является построение модели гетеродимера в комплексе с различными лигандами и сравнение этих моделей с ранее полученными данными.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Использовавшиеся в работе модели молекул сахаров.** В работе были использованы модели сахаров альфа-D-глюкозы, D-фруктуроната, D-галактуроната, D-глюконата и D-глюкуроната. 3D-модели сахаров получены из PubChem DB и подготовлены для моделирования с помощью программы OpenBabel (v. 2.2.3) [18]. Также были использованы фосфорилированные производные глюкозы (альфа-D-глюкозо-6-фосфат) и фруктозы (фруктозо-6-фосфат и фруктозо-1,6-бисфосфат). 3D-модели этих сахаров получены из PubChem или ChemSpider и подготовлены для моделирования с помощью пакета программ Avogadro (v. 1.2.0.) [19].

**Реконструкция димера UxuR.** Реконструкция трехмерной структуры димера UxuR осуществлена с использованием аминокислотной последовательности UxuR *Escherichia coli* K-12 MG1655 (T00007 KEGG K13637) [14], а димера ExuR – с использованием аминокислотной последовательности UxuR *Escherichia coli* K-12 MG1655 (T00007 KEGG K19775) [10]. Поиск модели и реконструкцию белка проводили с помощью онлайн-ресурса SWISS-MODEL [20]. За основу был взят белок GntR из *Streptococcus agalactiae* (PDB baz6) [21] с совпадением по последовательности 27.9% для UxuR и ExuR.

Реконструкция гетеродимера UxuR и ExuR на основе полученной в SWISS-MODEL модели проведена с использованием пакета программ



**Рис. 1.** Структура гетеродимера UxuR-ExuR, полученная на 100-й наносекунде молекулярно-динамической симуляции. Светло-серым цветом выделен мономер ExuR, темно-серым цветом – мономер UxuR. Структура гетеродимера представлена в двух проекциях, развернутых на 90° относительно друг друга, N-конец белка внизу.

Swiss-PdbViewer (v. 4.1.0) [22]. Полученная структура проведена через молекулярно-динамическую симуляцию для изучения позиционной вариабельности атомов в белке и выбора структур для докинга. Для этого использовали пакет программ OpenMMZephyr (v. 2.0.3) [23]. Симуляцию проводили при температуре 310.15 К в силовом поле Amber96 и среде «accurate water» в течение 100 нс. В качестве мишеней для докинга использовали структурные модели белка, соответствующие 50-й (далее 50 нс), 60-й (далее 60 нс), 90-й (далее 90 нс) и 100-й наносекунде (далее 100 нс) молекулярно-динамической траектории, что позволяло сравнить изменения структуры как на относительно коротком (10 нс), так и на более продолжительном (50 нс) периоде времени.

**Гибкий молекулярный докинг.** Гибкий молекулярный докинг осуществляли с использованием программного ресурса Autodock VINA package [24]. Все потенциально подвижные связи в структуре каждого лиганда сохраняли гибкими. Для каждого лиганда были определены места предпочтительного связывания и рассчитаны значения  $\Delta G$  (аффинность; чем больше изменение  $G$ , тем выше аффинность). Методом последовательного докинга определена заселенность каждой выявленной поверхности взаимодействия с лигандами. Для этого производилась серия последовательных расчетов, в каждом из которых учитывались результаты предыдущих раундов докинга, при этом лиганды с самой большой аффинностью последовательно добавлялись к мишени и полученные комплексы использовались в следующем раунде докинга. Для каждого углевода проводили по десять последовательных итераций.

Для визуализации результатов докинга использовали AutoDockToolsPython Molecular viewer (v. 1.5.6) [25].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Структура гетеродимера UxuR-ExuR.** В соответствии с общим планом организации транскрипционных факторов семейства GntR входящие в состав гетеродимера мономеры UxuR и ExuR были смоделированы как двухдоменные белки с ДНК-связывающими N-концевыми доменами, димеризационными/эффекторсвязывающими C-концевыми доменами и слабоструктурированными линкерами между доменами. Для проверки стабильности полученной структуры и изучения позиционной вариабельности атомов в белке гетеродимер UxuR-ExuR был проведен через молекулярно-динамическую симуляцию с продолжительностью траектории 100 нс (рис. 1).

N-концевой домен ExuR (Met1-Glu59) формировал три альфа-спирали, соответствующие мотиву wHtH. Заметной вариабельности структуры не наблюдалось, альфа-спирали были стабильны с редкими и временными смещениями на один аминокислотный остаток в какую-либо сторону. Для модели, соответствующей 90 нс, на участке Glu2-Glu5 однократно формировалась структура, подобная бета-слою. N-концевой домен UxuR (Met1-Lys60) организован аналогичным образом, альфа-спирали также оставались достаточно стабильны. В неструктурированных участках домена могли временно формироваться структуры, подобные бета-слою (Thr25-Tyr285 на структуре, соответствующей 50 нс).

С-концевой домен белков UxuR и ExuR сформирован семью альфа-спиралями, что соответствует структурам гомологичных белков подсемейства FadR. В ExuR С-концевой домен включал в себя аминокислотные остатки с Pro94 по Ser258. Формирующие этот домен альфа-спирали и их взаимная конфигурация сохраняли стабильность на всех рассмотренных точках молекулярно-динамической траектории за исключением незначительных смещений на один-три аминокислотных остатка или незначительных временных деформаций альфа-спиралей. В неструктурированных участках могли возникать структуры, подобные бета-слою (Gln115-Thr117 – в структуре, соответствующей траектории 50 нс; Gln141-Asp143 и Phe226-Glu228 – в структуре, соответствующей траектории 60 нс; Ser140-Thr142 – в структуре, соответствующей траектории 100 нс). С-концевой домен UxuR сформирован аминокислотными остатками с Pro95 по Ala257. Аналогично ExuR, образующие этот домен UxuR альфа-спирали и их взаимная ориентация оставались стабильны с незначительными вариациями размещения и низкой степенью деформации структуры. Небольшие подобные бета-слоям участки временно возникали в неструктурированных участках домена (Ser138-Ala140, Asn177-Pro179 в структуре, соответствующей траектории 50 нс; Lys228-Leu231 в структуре, соответствующей траектории 90 нс; Asp253-Ala257 в структуре, соответствующей траектории 100 нс).

Междоменные линкеры в обоих белках (Gly60-Gly93 в ExuR и Gly61-Gly94 в UxuR) оставались слабоструктурированными во всех рассмотренных точках молекулярно-динамической траектории. В них могло происходить формирование коротких временных участков, похожих на бета-слои (Phe70-Val72 в структуре, соответствующей траектории 50 нс и Val62-Arg65 в структуре, соответствующей траектории 90 нс для ExuR; Val63-Arg66 и Val63-Val 65 на структуре, соответствующей 50-й и 100-й наносекунде траектории для UxuR). В целом линкеры располагались достаточно компактно, приближая N-концевой домен белка к поверхности С-концевого домена так, что расположенные в линкерах аминокислотные остатки могли взаимодействовать с аминокислотными остатками белка N- и С-концевых доменов. Формирование области контакта между С-концевыми доменами белков осуществлялось за счет взаимодействий первой и четвертой альфа-спиралей С-концевых доменов обоих белков (Pro94-Thr114 и Ser157-Arg170 – для ExuR, Pro95-Gln374 и Ser162-Ser171 – для UxuR). Таким образом, структура гетеродимера оставалась стабильной на протяжении всей траектории молекулярно-динамической симуляции (рис. 2).

**Структура комплекса гетеродимера UxuR-ExuR с сахарами.** Изучение распределения по поверх-

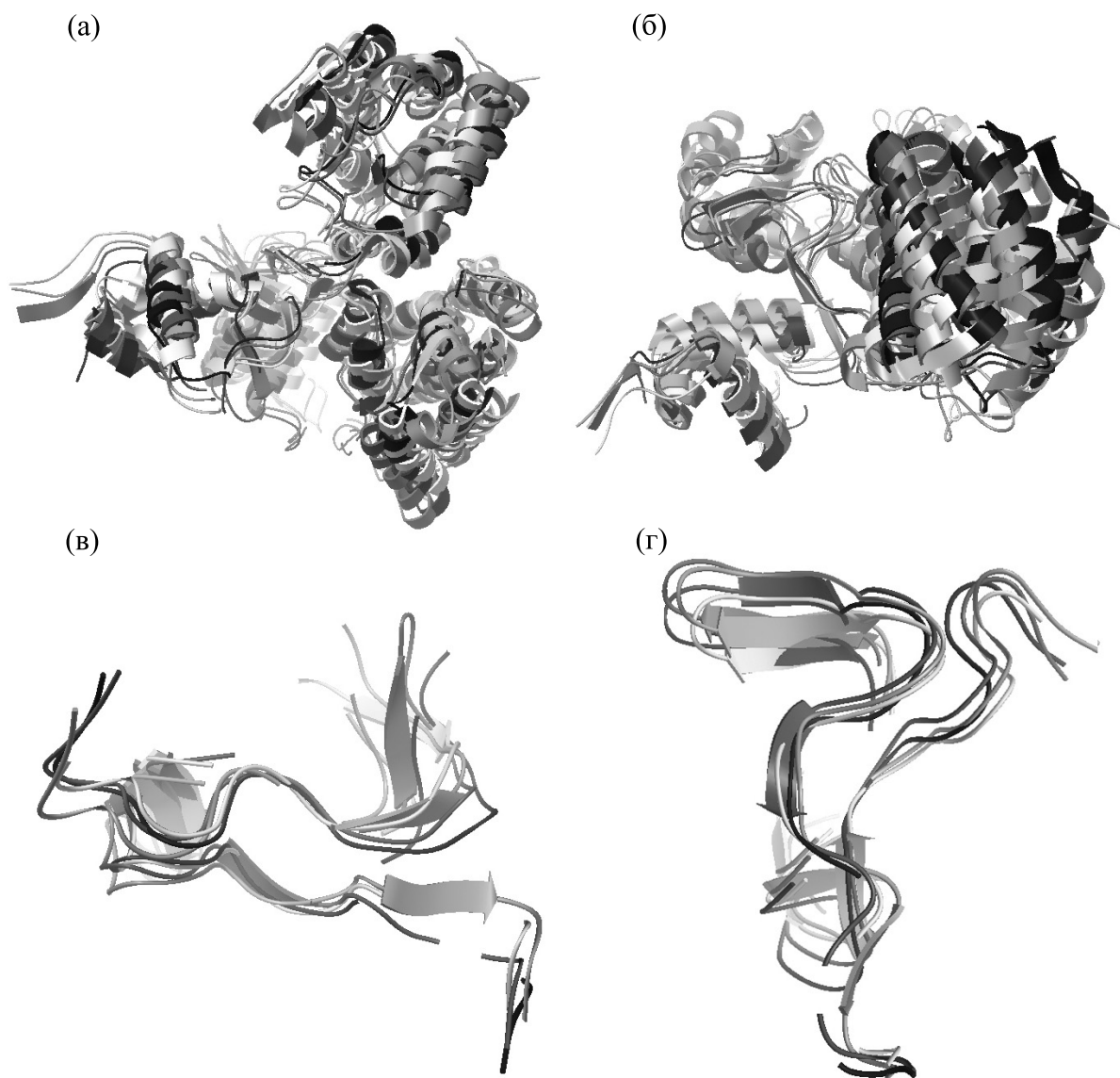
ности гетеродимера предсказываемых мест взаимодействия с сахарами показало, что поверхность, формируемая междоменными линкерами белков, предпочтительнее других мест связывания. Большинство рассмотренных сахаров при последовательном докинге формировали структуры, подобные тяжам, расположенным вдоль междоменных линкеров и прилегающих к ним участков, в прочих местах (преимущественно в пространстве между С-концевыми доменами) лиганды располагались редко (рис. 3).

Так, D-галактуронат, D-фруктуронат и альфа-D-глюкоза во всех четырех структурах формировали тяж на линкерах белка. D-глюкуронат формировал тяж в структурах с траекториями 60, 90 и 100 нс, тогда как в структуре 50 нс половина лигандов располагалась в пространстве между С-концевыми доменами. В отличие от трех сахаров, D-глюконат только в структуре 90 нс формировал отчетливый тяж. На остальных структурах с линкерами взаимодействовало около половины лигандов, остальные распределялись по поверхности белка.

К сожалению, варибельность значений аффинности, полученных в результате расчетов, в подавляющем большинстве случаев не позволяет уверенно говорить о специфичности взаимодействия лиганда с поверхностью белка. В норме диапазон изменения значений аффинности в пределах одного раунда докинга (разница между максимальным и минимальным значением аффинности в одном раунде докинга) не превышал 0.5 ккал/мол. Однако в ряде случаев диапазон изменения значений аффинности был больше этого значения (табл. 1).

Таким образом, четыре сахара могут продемонстрировать некоторую специфичность к участку взаимодействия на поверхности белка. Три из них (D-глюкуронат и D-галактуронат и в меньшей степени D-фруктуронат) предпочтительно связываются именно с междоменными линкерами белков. Область связывания D-глюконата локализована и охватывает дополнительно участки на поверхности С-концевых доменов. Высокое значение аффинности для альфа-D-глюкозы (1 ккал/мол для третьей итерации в структуре с временем моделирования 90 нс) связано по всей видимости с конфигурацией лигандов, полученных на первых двух итерациях докинга, рядом с которыми располагался лиганд третьей итерации.

Рассмотрение индивидуальных комплексов гетеродимера с молекулой сахара позволяет определить аминокислотные остатки, вовлеченные в такое взаимодействие. В UxuR такими остатками могут быть Gln8, Arg9, Gln12, Arg 19, Lys60, Arg67, Glu64, Arg66, Asp75, Asn76, Ser79, Gln80, Asn81, Asp83, Glu166, Arg169 и Ser171; в ExuR – Glu57,



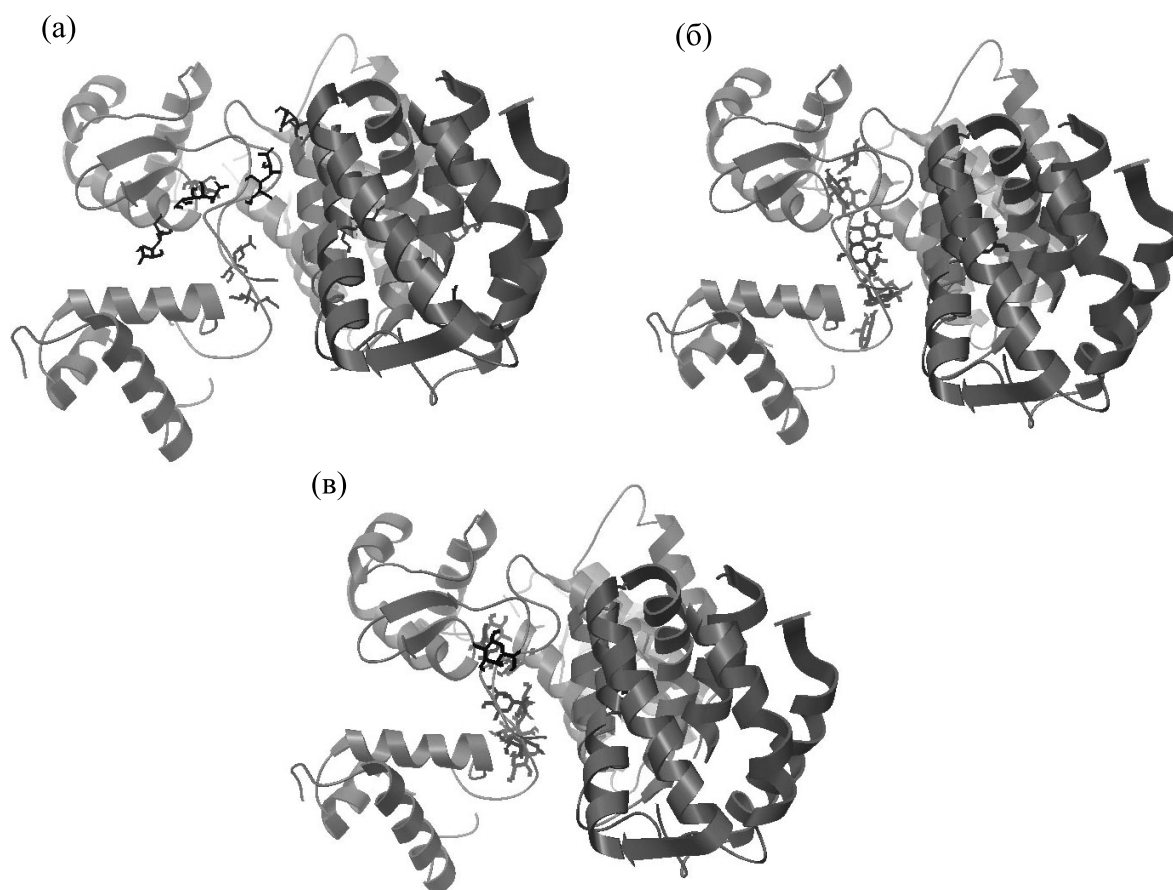
**Рис. 2.** Наложение структур гетеродимера UxuR-ExuR, полученных на 50-й, 60-й, 90-й и 100-й наносекундах молекулярно-динамической симуляции. Светло-серый цвет соответствует структуре 50 нс, темно-серый – 100 нс, промежуточные варианты – 60 нс и 90 нс соответственно. (а), (б) – Структуры гетеродимера в двух проекциях, развернутых на  $90^\circ$  относительно друг друга, N-конец белка находится слева; (в) – структура линкера, вид со стороны С-концевого домена; (г) – структуры линкера, вид с боковой стороны белка, соответствует линкеру на рис. (б).

Glu63, Arg65, Lys66, Asn75, Arg78, Gln80, Glu88, Asn107, Gln145, Glu164, Arg170, Ser171 и Asn173.

Таким образом, предсказанное взаимодействие гетеродимера UxuR-ExuR с молекулами сахаров происходило преимущественно на поверхности, формируемой междоменными линкерами и пространственно прилегающими к ним поверхностями первой и четвертой альфа-спиралей белков. Кроме этого, имело место взаимодействие сахаров с некоторыми межспиральными неструктурированными участками С-концевых доменов обоих белков. Тем не менее линкерный участок между доменами в большей степени вовлечен во

взаимодействие с сахарами, чем любая другая поверхность белка. По всей видимости, взаимодействие сахаров именно с этой областью будет оказывать влияние на структуру гетеродимера UxuR-ExuR.

**Структура комплекса гетеродимера UxuR-ExuR с фосфорилированными производными сахаров.** Помимо сахаров было изучено взаимодействие с гетеродимером некоторых фосфорилированных производных этих сахаров. Альфа-D-глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат и фруктозо-1,6-бисфосфат являются компонентами практически

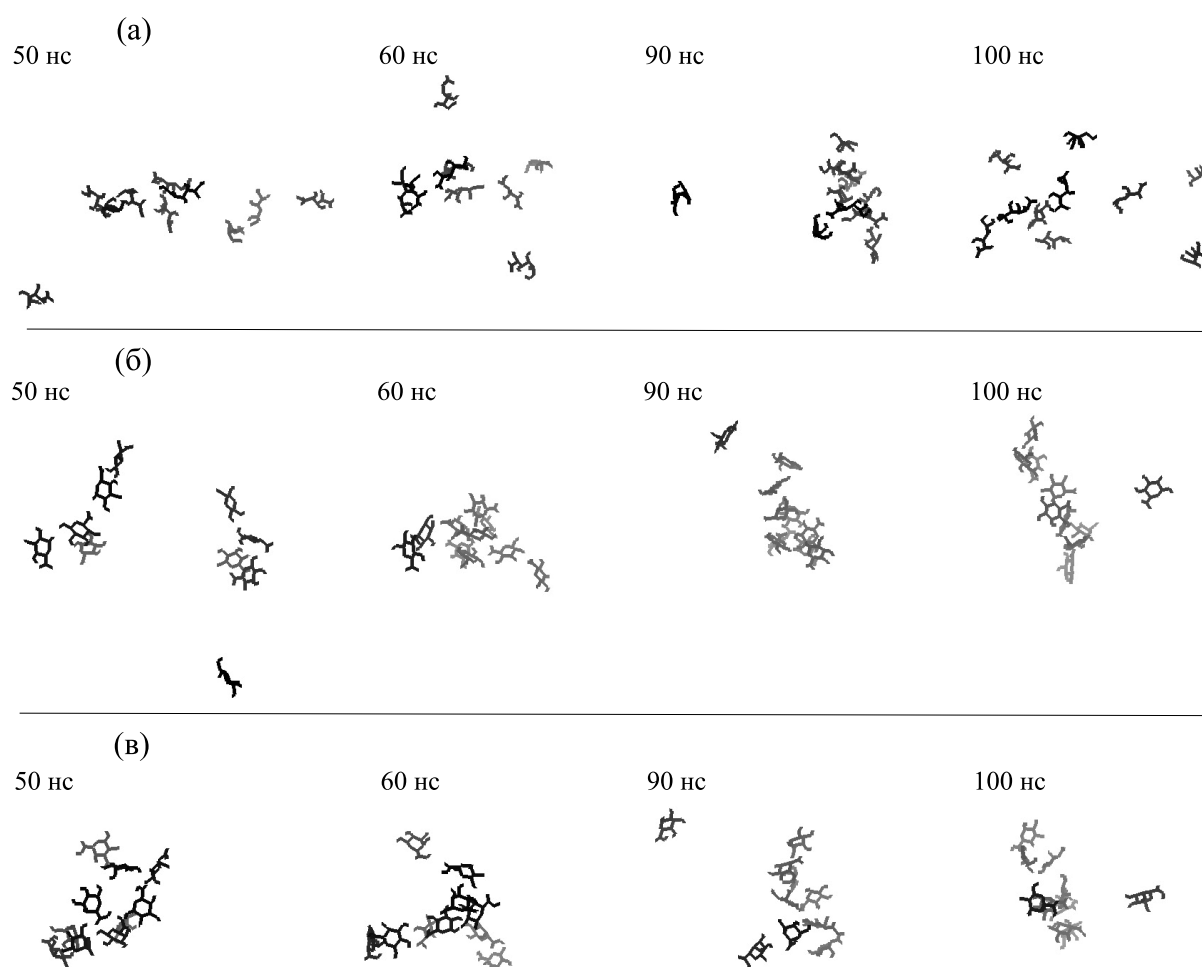


**Рис. 3.** Распределение по поверхности гетеродимера UxuR-ExuR (структура с траекторией 100 нс) моделей D-глюкозата (а), D-глюкуроната (б) и D-галактуроната (в).

**Таблица 1.** Распределение итераций последовательного докинга лигандов сахаров на моделях гетеродимера, полученных в результате молекулярно-динамической симуляции, с повышенным диапазоном изменения значений аффинности (>0.5 ккал/мол)

	50 нс	60 нс	90 нс	100 нс
Альфа-D-глюкоза			3 (1 ккал/мол)	
D-глюконат	<i>1 (0.8 ккал/мол)</i> 8 (0.9 ккал/мол)	<b>4 (0.6 ккал/мол)</b>	8 (0.6 ккал/мол)	<b>3 (0.7 ккал/мол)</b> <b>6 (0.7 ккал/мол)</b>
D-глюкуронат	<i>1 (0.7 ккал/мол)</i>	2 (0.8 ккал/мол) 5 (0.6 ккал/мол) 6 (0.7 ккал/мол) 10 (0.9 ккал/мол)	4 (0.7 ккал/мол) 8 (0.7 ккал/мол)	2 (0.7 ккал/мол) 4 (0.6 ккал/мол) 7 (0.8 ккал/мол) 8 (0.7 ккал/мол)
D-галактуронат	<i>1 (0.8 ккал/мол)</i> 2 (0.9 ккал/мол)	<i>1 (0.6 ккал/мол)</i> 7 (0.6 ккал/мол)	5 (0.6 ккал/мол) 6 (0.7 ккал/мол) 9 (0.8 ккал/мол)	4 (0.6 ккал/мол) 9 (0.6 ккал/мол)
D-фруктуронат		9 (0.6 ккал/мол) 10 (0.9 ккал/мол)	4 (0.7 ккал/мол)	<b>4 (0.8 ккал/мол)</b> 9 (0.6 ккал/мол) 10 (0.7 ккал/мол)

Примечание. В скобках указан диапазон изменения значений аффинности для приведенных номеров итераций докинга. Курсивом обозначены итерации со связыванием лиганда с UxuR, прямым шрифтом – с ExuR. Темно-серым цветом отмечены итерации с размещением лиганда на С-концевом домене, кроме 1-й и 4-й альфа-спиралей; светло-серым – между С-концевыми доменами; без окраски – на линкере и на 1-й и 4-й альфа-спиральных С-концевого домена.



**Рис. 4.** Распределение лигандов D-глюконата (а), D-глюкуроната (б) и D-галактуроната (в) на моделях гетеродимера, полученное в результате молекулярно-динамической симуляции. Ориентация белка соответствует представленной на рис. 3.

всех ферментативных циклов в клетке и также могут взаимодействовать с поверхностью белка.

Распределение этих трех фосфорилированных производных сахаров по поверхности гетеродимера в целом воспроизводит распределение сахаров. Наиболее предпочтительной оставалась поверхность, формируемая междоменными линкерами белков. Однако распределялись фосфорилированные производные более разреженно, и большая их часть взаимодействовала с другими участками белковой поверхности, в основном с С-концевым доменом (рис. 5). Варибельность значений аффинности в большинстве случаев также не превышала 0.5 ккал/мол, но, как и в случае с сахарами, в некоторых итерациях докинга для каждого фосфорилированного производного значения аффинности позволяют предполагать несколько большую специфичность связывания лигандов для определенных участков поверхности белка.

Несмотря на то что фосфорилированные производные сахаров, так же как и сами сахара, в основном связываются с областью междоменных линкеров и прилегающими областями на С-концевых доменах гетеродимера, их молекулы распределены более диффузно. Молекулы альфа-D-глюкоза-6-фосфата ( $157 \text{ \AA}^2$ ), фруктозы-6-фосфата ( $165 \text{ \AA}^2$ ) и фруктозы-1,6-бисфосфата ( $203 \text{ \AA}^2$ ) несколько крупнее, чем молекулы рассмотренных ранее сахаров (D-галактоуронат ( $127 \text{ \AA}^2$ ), D-глюкуронат ( $138 \text{ \AA}^2$ ), D-фруктуронат ( $127 \text{ \AA}^2$ ), альфа-D-глюкоза ( $110 \text{ \AA}^2$ )), что может затруднять их адаптацию к относительно подвижной поверхности линкеров (рис. 6). Взаимодействие фосфорилированных производных сахаров происходит с теми же аминокислотными остатками в белках, что и при взаимодействии с простыми сахарами. Таким образом, фосфорилированные производные сахаров сохраняют способность взаимодействовать с областью междоменных линкеров и

**Таблица 2.** Распределение итераций последовательного докинга лигандов фосфорилированных производных сахаров на моделях гетеродимера, полученных в результате молекулярно-динамической симуляции, с повышенным диапазоном изменения значений аффинности ( $>0.5$  ккал/мол)

	50 нс	60 нс	90 нс	100 нс
Альфа-D-глюкоза-6-фосфат	<i>1 (0.6 ккал/мол)</i> <i>9 (0.7 ккал/мол)</i>	<i>3 (0.6 ккал/мол)</i> <i>7 (0.7 ккал/мол)</i> <i>8 (0.8 ккал/мол)</i>	1 (0.6 ккал/мол) 3 (0.6 ккал/мол) 4 (0.8 ккал/мол) <i>10 (0.6 ккал/мол)</i>	2 (0.8 ккал/мол) <i>6 (0.6 ккал/мол)</i> <i>9 (0.7 ккал/мол)</i> <i>10 (0.7 ккал/мол)</i>
Фруктозо-6-фосфат	<i>1 (0.8 ккал/мол)</i> 2 (0.8 ккал/мол) <i>4 (0.9 ккал/мол)</i> <i>7 (0.6 ккал/мол)</i>	<i>2 (0.8 ккал/мол)</i> <i>6 (1 ккал/мол)</i> 7 (0.6 ккал/мол) 8 (0.6 ккал/мол) 9 (0.8 ккал/мол)	4 (0.8 ккал/мол) 8 (0.8 ккал/мол)	<i>1 (0.7 ккал/мол)</i> <i>5 (0.7 ккал/мол)</i> <i>7 (0.7 ккал/мол)</i> <i>9 (0.7 ккал/мол)</i>
Фруктозо-1,6-бисфосфат	8 (0.6 ккал/мол) <i>9 (0.7 ккал/мол)</i>			<i>1 (0.6 ккал/мол)</i> <i>3 (0.6 ккал/мол)</i> 8 (0.9 ккал/мол) <i>9 (0.7 ккал/мол)</i>

Примечание. В скобках указан диапазон изменения значений аффинности для приведенных итераций докинга. Курсивом обозначены итерации со связыванием лиганда с UxuR, прямым шрифтом — с ExuR. Светло-серым цветом отмечены итерации с размещением лиганда между С-концевыми доменами; без окраски — на линкере и на 1-й и 4-й альфа-спиралях С-концевого домена.

прилегающих областей на поверхности белков и, тем самым, влиять на гетеродимер UxuR-ExuR.

## ОБСУЖДЕНИЕ

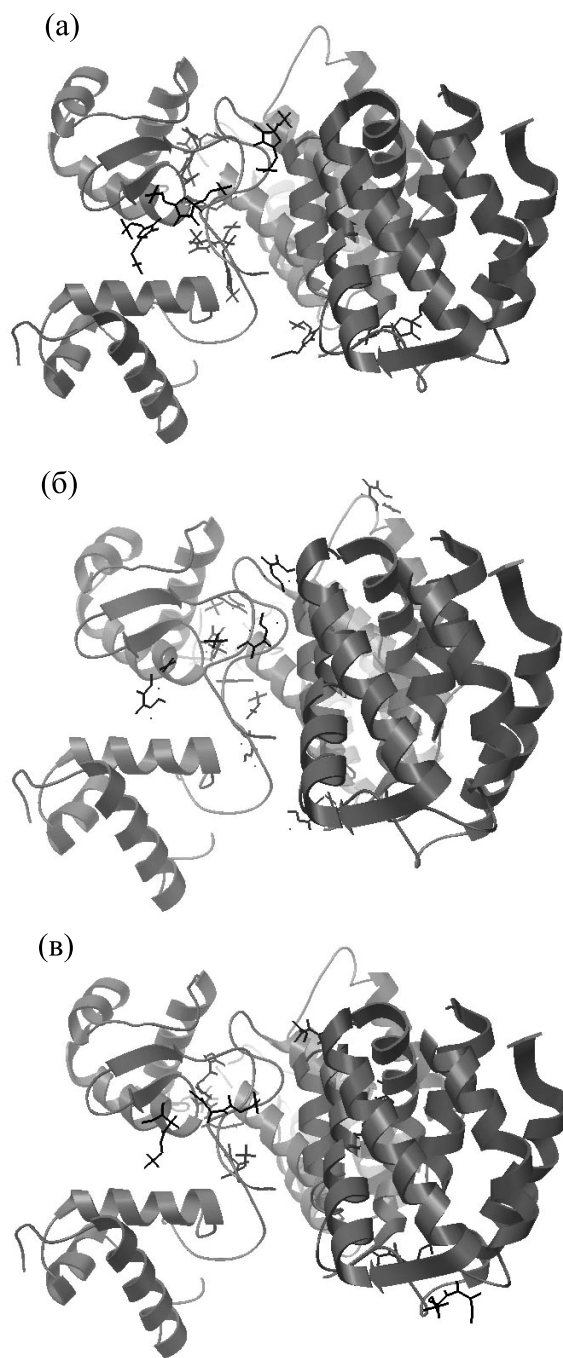
Как ранее было показано, взаимодействие различных сахаров с димером UxuR и мономерами UxuR и ExuR происходит примерно с одной и той же областью на поверхности белка, включающей в себя линкер и прилегающие альфа-спирали С-концевого домена, и с невысокой аффинностью, слабо варьирующей от сахара к сахару [17]. Кроме того, D-фруктуронат, D-галактуронат и D-глюкуронат способны взаимодействовать с «карманом» на С-концевом домене UxuR, влияя тем самым на укладку альфа-спиралей в домене и, посредством этого, на конформацию междоменного линкера и ориентацию N-концевого домена относительно С-концевого домена и ДНК-мишени.

В исследуемом в данной работе комплексе гетеродимера с лигандами складывается в целом схожая ситуация. Основной мишенью для всех лигандов оказываются междоменные линкеры белков. Взаимодействие с «карманом» в С-концевом домене UxuR не происходит, что предполагает отсутствие у гетеродимера UxuR-ExuR способности регулировать транскрипцию с генов-мишеней UxuR. Аффинность взаимодействия гетеродимера к лигандам остается в основном не-

высокой и варьируется незначительно. Однако в случае некоторых сахаров (D-глюкуроната, D-галактоуроната и, в меньшей степени, D-фруктуроната) значения аффинности, полученные в итерациях докинга, имеют более высокие значения. Молекулы D-глюконата распределены по поверхности белка более диффузно, а в случае D-глюкозы специфичность взаимодействия невысока. Для фосфорилированных производных сахаров наблюдается аналогичная D-глюконату модель взаимодействия.

Междоменные линкеры, как правило, являются неструктурированными и лабильными участками белковой цепи. Несмотря на определенное постоянство их структуры, она достаточно подвижна, чтобы провоцировать изменение распределения по нему лигандов (при докинге в структурах 50 нс, 60 нс, 90 нс и 100 нс). Аффинность сахаров при этом также варьируется. Исходя из степени их вовлеченности во взаимодействие с несколькими лигандами (рис. 4 и 6), междоменные линкеры представляют собой некий интерфейс, несводимый к простому набору составляющих его аминокислотных остатков. Вариативность мест взаимодействия лигандов и вариативность аффинности такого взаимодействия предполагает, что чем выше количество лиганда, тем выше шанс для него «встретиться» с линкерами, находящимися в «нужной» конформации.

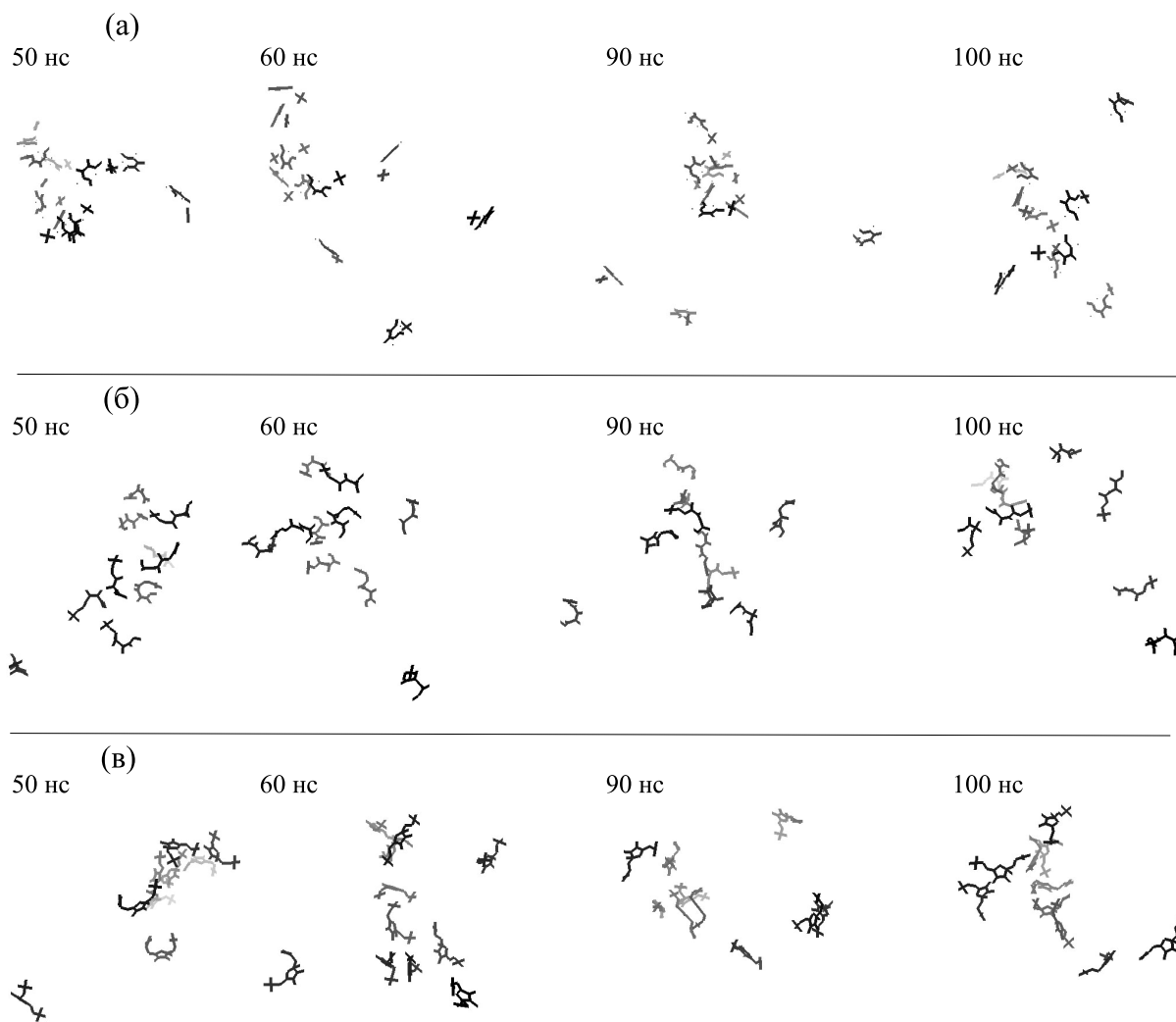




**Рис. 5.** Распределение по поверхности гетеродимера UxuR-ExuR (100 нс) моделей альфа-D-глюкозы (а), фруктозо-6-фосфата (б) и фруктозо-1-6-бисфосфата (в).

Таким образом, модель регуляции транскрипции генов, находящихся под контролем белка UxuR, можно дополнить следующим образом. При наличии в среде глюкуроната он связывается с гетеродимером UxuR-ExuR. Различия в конформациях подвижных линкеров белков могут приводить к формированию комплексов с различной стабильностью, определяемой местом

связывания лиганда на линкере и аффинностью такого связывания. Некоторые комплексы могут быть более стабильными за счет того, что поверхность, формируемая белковыми линкерами, будет в конфигурации, пригодной для более специфичного взаимодействия с глюкуронатом, что может привести к дополнительной фиксации линкеров относительно доменов белков и фикса-



**Рис. 6.** Распределение лигандов альфа-D-глюкозы (а), фруктозо-6-фосфата (б) и фруктозо-1,6-бисфосфата (в) на моделях гетеродимера, полученных в результате молекулярно-динамической симуляции. Ориентация белка соответствует представленной на рис. 5.

ции доменов относительно друг друга. В результате более стабильные комплексы гетеродимеров UxuR-ExuR с глюкуронатом будут накапливаться, а количество мономеров UxuR, способных формировать гомодимер, будет уменьшаться, что снизит репрессию регулона UxuR.

Возможно, D-галактуронат будет взаимодействовать с гетеродимером UxuR-ExuR похожим образом, с проявлением аналогичного влияния на активность UxuR как транскрипционного фактора. В пользу этого свидетельствует сходство предсказываемых для него комплексов с гетеродимером с комплексами гетеродимера с D-глюкуронатом. Вариабельность интерфейса на линкере позволяет предположить концентрационно-зависимый от глюкуроната характер регуляции транскрипционной активности генов регулона

UxuR. Вероятность зафиксировать короткоживущую «нужную» конформацию линкера, которая необходима для образования стабильного комплекса с лигандом (или с несколькими молекулами лиганда), выше при относительно высоком количестве лиганда в среде (D-глюкуроната и, возможно, D-галактуроната). Мы предполагаем, что таким образом может осуществляться баланс между репрессией генов ферментов пути Эшвелла и количеством субстрата в среде.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00322).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. B. Fillenberg, F. C. Grau, G. Seidel, and Y. A. Muller, *Nucl. Acids Res.* **43**, 1283 (2015).
2. K. Miyazono, N. Tabei, S. Morita, et al., *J. Bacteriol.* **194**, 607 (2012).
3. F. Jacob and J. Monod, *J. Mol. Biol.* **3**, 318 (1961).
4. S. E. Bondos, L. Swint-Kruse, and K. S. Matthews, *J. Biol. Chem.* **290**, 24669 (2015).
5. M. A. Schumacher, G. S. Allen, M. Diel, et al., *Cell* **118**, 731 (2004).
6. C. G. Kalodimos, *Science* **305**, 386-389 (2004).
7. M. Lewis, G. Chang, N. C. Horton, et al., *Science* **271**, 1247 (1996).
8. R. Portalier, J. Robert-Baudouy, and F. Stoeber, *J. Bacteriol.* **143**, 1095 (1980).
9. P. Ritzenthaler, M. Mata-Gilsinger, and F. Stoeber, *J. Bacteriol.* **143**, 1116 (1980).
10. D. A. Rodionov, A. A. Mironov, A. B. Rakhmaninova, and M. S. Gelfand, *Mol. Microbiol.* **38**, 673 (2000).
11. S. Rigali, A. Derouaux, F. Giannotta, and J. Dusart, *J. Biol. Chem.* **277**, 12507 (2002).
12. L. Aravind, V. Anantharaman, S. Balaji, et al., *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 231 (2005).
13. D. Jain, *IUBMB Life* **67**, 556 (2015).
14. C. B. Utz, A. B. Nguyen, D. J. Smalley, et al., *J. Bacteriol.* **186**, 7690 (2004).
15. M. N. Tutukina, A. V. Potapova, P. K. Vlasov, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.* **34**, 2296 (2016).
16. M. N. Tutukina, A. V. Potapova, J. A. Cole, and O. N. Ozoline, *Microbiology* **162**, 1220 (2016).
17. Ю. А. Пуртов, М. Н. Тутукина, А. Д. Никулин и О. Н. Озолин, *Биофизика* **64**, 61 (2019).
18. N. M. O'Boyle, M. Banck, C. A. James, et al., *J. Cheminform.* **3**, 33 (2011).
19. M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, et al., *J. Cheminform.* **4**, 17 (2012).
20. A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, et al., *Nucl. Acids Res.* **46**, W296 (2018).
21. M. S. Little, S. J. Pellock, W. G. Walton, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, E152 (2018).
22. N. Guex and M. C. Peitsch, *Electrophoresis* **18**, 2714 (1997).
23. M. S. Friedrichs, P. Eastman, V. Vaidyanathan, et al., *J. Comput. Chem.* **30**, 864 (2009).
24. O. Trott and A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **31**, 455 (2009).
25. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, et al., *J. Comput. Chem.* **30**, 2785 (2009).

## Modeling the Interaction of the UxuR-ExuR Heterodimer with the Components of the Metabolic Pathway for Hexuronate Utilization in *Escherichia coli*

Y.A. Purtov\*, \*\*, S.V. Tishchenko\*, and A.D. Nikulin\*

\* *Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 4, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

\*\* *Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The UxuR transcription factor is a repressor for a number of genes of the hexuronate catabolism. This protein can form heterodimers with its paralogous ExuR protein, leading to activation of repressed UxuR genes in the presence of glucuronate. Previously, when sequential molecular docking was done with the flexible receptor, it was predicted that sugars bind to the interdomain linkers UxuR and ExuR, affecting the mutual arrangement of the protein domains. Similar calculations for the models of the UxuR-ExuR heterodimer, corresponding to four points of its molecular dynamics simulation, also predict the binding of sugars to interdomain linkers. Changes in protein conformation modulate the location and degree of affinity of this interaction. A new hypothesis argues that UxuR-ExuR-glucuronate complexes become more stable with increased binding affinity to some conformations of protein interdomain linkers. This may lead to a decrease in the number of free monomers and, therefore, UxuR homodimers in the presence of these sugars, and relieves the UxuR-mediated repression of its regulon.

*Keywords: UxuR-ExuR heterodimer, transcription regulation, hexuronates, flexible molecular docking, protein conformational changes*