

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 538.911

ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ, МИШЕНЬЮ КОТОРОГО БЫЛИ СИГНАЛЫ ДИМЕРИЗАЦИИ ДВУХ МИКОПЛАЗМЕННЫХ HU-БЕЛКОВ, ВЫЯВИЛ РАЗНЫЕ ТИПЫ ИНГИБИТОРОВ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С ОБЩИМИ ДЕТЕРМИНАНТАМИ СВЯЗЫВАНИЯ

© 2019 г. Ю. К. Агапова^{1,*}, А. А. Талызина^{2,**}, Д. А. Алтухов¹, А. Л. Лаврентьев³,
В. И. Тимофеев^{1,4}, Т. В. Ракитина^{1,5,***}

¹ НБИКС-центр, Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт, Москва, Россия

³ Центральный научно-исследовательский институт машиностроения, Королёв, Россия

⁴ Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

⁵ Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

* E-mail: agapova.jk@gmail.com

** E-mail: anna.talyzina@phystech.edu

*** E-mail: taniarakitina@yahoo.com

Поступила в редакцию 05.07.2018 г.

После доработки 05.07.2018 г.

Принята к публикации 18.07.2018 г.

ДНК-связывающие HU-белки, необходимые для поддержания структуры нуклеоида, являются перспективной фармакологической мишенью для разработки новых антибиотиков. Проведен виртуальный поиск низкомолекулярных соединений, способных специфически взаимодействовать с димеризационным сигналом двух микоплазменных HU-белков. Стабильность комплексов лигандов с белками-мишенями проверена с помощью молекулярно-динамической симуляции. Анализ аминокислотного окружения лигандов показал, что ингибиторы, мишенью которых является димеризационный сигнал — консервативная аминокислотная последовательность, участвующая в формировании и поддержании стабильности HU-димеров и расположенная в междимерном бэта-листе, имеют второй центр связывания, локализованный в альфа-спиральном домене. Детерминанты связывания ингибиторов в димерных интерфейсах белков идентичны и не зависят от различий аминокислотных последовательностей. Следовательно, HU-белки имеют два центра формирования димерного интерфейса, что необходимо учитывать при создании ингибиторов димеризации.

DOI: 10.1134/S0023476119030020

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные, ДНК-связывающие гистон-подобные HU-белки относятся к семейству белков, ассоциированных с нуклеоидом (NAP — *nucleoid-associated protein*), и необходимы для поддержания суперскрученности и компактизации геномной ДНК прокариотической клетки [1]. Гены HU-белков найдены во всех известных на сегодня бактериальных геномах [2]. Генетический нокаут или химическое ингибирование HU-белков подавляет рост сложноустроенных бактерий, экспрессирующих полный набор NAP [3]. Для микоплазм (*Mollicutes*), где HU-белки являются единственными представителями NAP, их потеря приводит к гибели организма [4, 5]. Поэтому структурные исследования микоплазменных HU-белков и поиск химических лигандов, спо-

собных ингибировать ДНК-связывающие функции, с целью разработки новых антиминоплазменных средств являются актуальными практическими задачами.

Цель данной работы — поиск ингибиторов микоплазменных HU-белков, направленных на один из наиболее консервативных участков молекулы, — димеризационный сигнал (ДС). HU-белки, как и близкородственные им белки семейства IHF, представляют собой маленькие (молекулярная масса около 10 кДа) положительно заряженные (pI около 9) белки, которые функционируют в виде гомо- или гетеродимеров [2]. Каждый мономер в димере состоит из альфа-спирального домена и ДНК-связывающего домена, состоящего из нескольких бэта-слоев, разделенных неструктурированными петлями. ДС — это консер-

вативная аминокислотная последовательность (GFGXF), расположенная в соединяющей два бэта-слоя петле и участвующая в формировании и поддержании стабильности HU-димеров за счет межсубъединичных стэкинг-взаимодействий между боковыми радикалами остатков фенилаланина [6].

Ранее были получены и депонированы в базу данных PDB три новые пространственные структуры рекомбинантных HU-белков из микоплазм *S. melliferum* (HUSpm) и *M. gallisepticum* (HUMgal) (PDB_ID: 5L8Z, 2NDP, 5OGU) [7–13]. Кристаллическая структура HUSpm (5L8Z) позволила предложить новый (ранее не описанный для HU-белков) структурный механизм термостабильности данного белка [11], а также начать поиск низкомолекулярных ингибиторов ДНК-связывания [14]. Молекулярно-динамические модели (структуры в растворе) HUMgal и HUSpm позволили сравнить конформационно-динамические свойства данных белков друг с другом и создали основу для изучения конформационно-динамических изменений, происходящих в белках при связывании ДНК и ингибиторов ДНК-связывания [12, 13].

В рамках данной работы проведен виртуальный высокопроизводительный скрининг химической библиотеки Mcule (<https://mcule.com/>) с целью поиска низкомолекулярных ингибиторов HUMgal и HUSpm, способных нарушать формирование функционального HU-димера. Установлено, что детерминанты связывания ингибиторов в димерных интерфейсах обоих белков практически одинаковы и что ингибиторы, мишенью которых является аминокислотная последовательность ДС, имеют второй центр связывания, расположенный в альфа-спиральном домене. Полученные результаты указывают на то, что HU-белки могут иметь два центра формирования димерного интерфейса: ДС – в междимерном бэта-листе и второй центр – в альфа-спиральном домене. Этот факт следует учитывать при создании ингибиторов HU-белков, мишенью которых является димерный интерфейс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск потенциальных ингибиторов с помощью интернет-сервиса Mcule. В качестве мишеней для поиска новых ингибиторов выбраны микоплазменные HU-белки из HUSpm и HUMgal. Структура HUSpm (PDB_ID: 5L8Z) была получена методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 1.36 Å [11]. Структура HUMgal получена методом моделирования по гомологии с использованием программы Modeller [15] и структуры HUSpm как исходной модели. В качестве сайта связывания при поиске ингибиторов выбран один из наиболее консервативных участков HU-

белков, участвующих в формировании и поддержании стабильности HU-димеров, и названный димеризационным сигналом [6]. У HUSpm последовательность ДС (GFGKF) соответствовала канонической (GFGXF), а у HUMgal она была в значительной степени вырождена (DIGKF).

Поиск ингибиторов с заданным мишень-специфическим профилем проводили в библиотеке коммерчески доступных соединений Mcule (<https://mcule.com/>). Виртуальный скрининг библиотеки Mcule проводили с использованием алгоритма Autodock Vina [16]. На основании оценочной функции докинга и с учетом требований правила Липински [17] для анализа было отобрано по 10 соединений для HUMgal и HUSpm (табл. 1).

Исследование результатов виртуального скрининга с помощью методов молекулярной динамики (МД). Стабильность комплексов HU-белков с отобранными по результатам молекулярного докинга соединениями была изучена в МД-эксперименте. При проведении МД-симуляции в качестве силового поля выбрано поле AMBER99SB [18]. Топология каждого из найденных соединений построена при помощи программного пакета ACSYRE [19]. Каждый комплекс был помещен в кубическую ячейку, заполненную водой с добавлением ионов Na⁺, необходимых для того, чтобы суммарный заряд ячейки оставался нулевым. В качестве модели молекулы воды выбран тип TIP3P.

На первом этапе МД-эксперимента была проведена минимизация энергии комплекса для релаксации любых возможных искажений. Затем на подвижность атомов системы наложили ограничения, и при помощи симуляции системы в баростате и термостате установили температуру 300 К и давление 1 атм. После снятия всех ограничений провели МД-эксперимент, параметры которого представлены в табл. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск химических ингибиторов, мишенью которых были сигналы димеризации двух микоплазменных HU-белков (HUSpm и HUMgal), проведенный с помощью интернет-сервиса Mcule в одноименной базе данных, позволил на основании оценочной функции докинга и правила Липински отобрать по 10 соединений для каждого из исследуемых белков. Формулы соединений приведены на рис. 1, а их основные характеристики представлены в табл. 1. Как видно из табл. 1, практически все ингибиторы соответствовали эмпирическому правилу Липински, согласно которому химический ингибитор будет иметь фармакологическое значение, если он имеет массу меньше 500 Да, число доноров водородной связи меньше пяти, число акцепторов водо-

Таблица 1. Характеристики лигандов, найденных в базе данных Mcule.

Лиганд	Mcule-ID	Прочность связывания ккал/моль	Масса, Да	log P	Число доноров Н-связей	Число акцепторов Н-связей
HUSpm1	8632516596-0-1	-7.9	445.463	6.2275	5	0
HUSpm2	9915492733-0-1	-7.7	437.388	6.6775	4	1
HUSpm3	6222176423-0-1	-7.6	639.286	4.2644	7	0
HUSpm4	9244032765-0-1	-7.6	436.529	5.1894	5	1
HUSpm5	1141743000-0-1	-7.6	471.344	7.18988	4	1
HUSpm6	2008449222-0-1	-7.6	425.521	4.9356	5	1
HUSpm7	4880052315-0-1	-7.5	497.381	6.488	4	0
HUSpm8	2587682231-0-1	-7.5	408.533	6.0942	3	1
HUSpm9	9464510782-0-1	-7.5	400.455	5.06028	6	0
HUSpm10	3333751441-0-1	-7.5	436.457	4.8806	6	2
HUMgal1	8782079010-0-1	-9.5	498.659	8.3996	7	1
HUMgal2	3508526092-0-2	-8.3	482.530	6.044	5	1
HUMgal3	2525494052-0-1	-8.0	396.436	7.4124	5	1
HUMgal4	1330263745-0-1	-7.9	512.556	4.2756	6	1
HUMgal5	9129498213-0-1	-7.9	439.436	3.0143	3	0
HUMgal6	9621296929-0-2	-7.8	459.465	5.16918	3	1
HUMgal7	4460170815-0-1	-7.7	554.635	4.6974	8	1
HUMgal8	3560424830-0-1	-7.6	425.503	4.9538	3	0
HUMgal9	2758134905-0-1	-7.5	489.002	6.3486	7	1
HUMgal10	3594035688-0-3	-7.5	412.872	5.6421	4	1

родной связи меньше 10, а также липофильность (logP) меньше пяти. Именно эти параметры (малый размер молекул и растворимость в воде, которая повышается при увеличении количества доноров и акцепторов водородных связей и уменьшении величины LogP) определяют биодоступность ингибитора. При этом надо учитывать, что при увеличении количества доноров и акцепторов водородных связей увеличивается способность ингибитора формировать неспецифические контакты, поэтому на эти параметры накладывают ограничения.

Устойчивость комплексов, формируемых ингибиторами с белками-мишенями, была проверена МД-методом. МД-симуляция, параметры которой представлены в табл. 2, подтвердила стабильность взаимодействий, формирующихся между найденными соединениями и аминокислотными остатками белков.

С помощью программы LigPlot [20] проведен анализ аминокислотного окружения каждого из лигандов и выявлены аминокислоты, способные формировать с атомами лигандов полярные (расстояние до 3.35 Å) и гидрофобные (расстояние

Таблица 2. Параметры молекулярно-динамического эксперимента

Система в термостате	
Термостат	Berendsen
Температура, К	300
Система в баростате	
Баростат	Parrinello-Rahman
Устанавливаемое давление, атм	1
Температура, К	300
Продолжительность NVT- и NPT-динамики, пс	100
Шаг временной сетки, пс	0.002
Молекулярная динамика	
Шаг временной сетки <i>dt</i> , пс	0.002
Количество шагов	1000000
Длина траектории, нс	1
Количество записанных фреймов	50
Интегратор	Leap-frog
Число используемых ядер суперкомпьютера	256

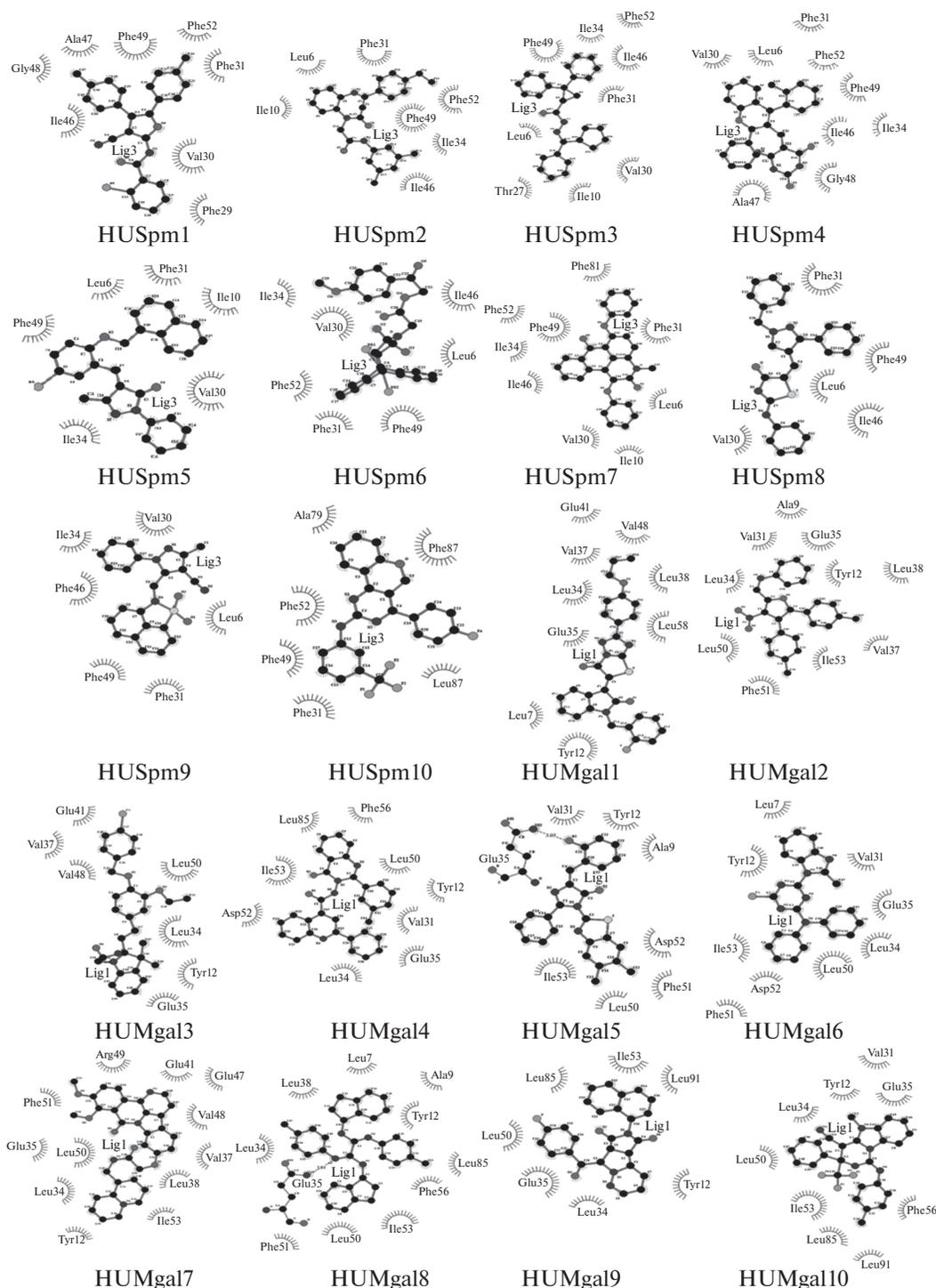


Рис. 1. Аминокислотное окружение 10 лигандов, отобранных на основании оценочной функции докинга и с учетом требований правила Липински, в интерфейсах димеризации белков HUSpm и HUMgal. Нумерация ингибиторов такая же, как в табл. 1.

3.90 Å) взаимодействия. Результаты анализа представлены на рис. 1.

Как и ожидалось, в большинстве случаев связывание лигандов в гидрофобном интерфейсе HU-белков обусловлено гидрофобными взаимо-

действиями, в то же время в случае HUMgal найдены два соединения (HUMgal5 и HUMgal8), формирующие водородную связь с аминокислотным остатком Q35 (рис. 1). Обнаружено, что во взаимодействиях с отобранными лигандами

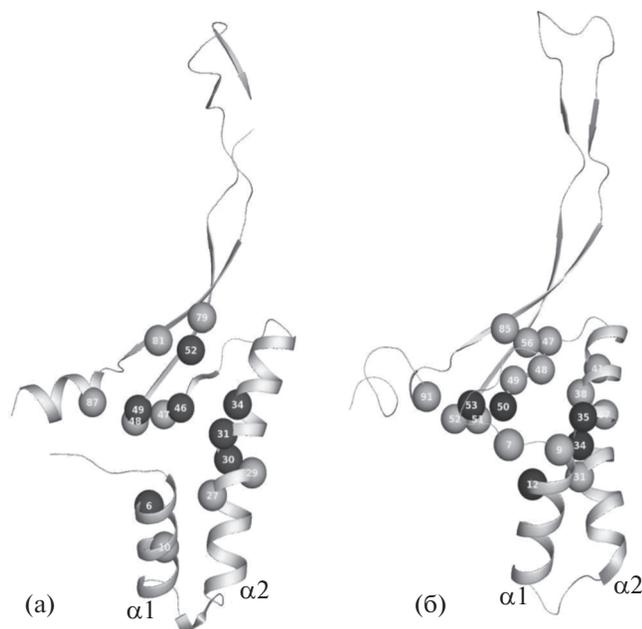


Рис. 2. Положение аминокислотных остатков, образующих контакты с найденными лигандами, на моделях пространственных структур мономеров HUSpm (а) и HUMgal (б). Показаны элементы вторичной структуры. Аминокислотные остатки, взаимодействующие хотя бы с одним из найденных лигандов, выделены сферами. Более темные сферы указывают основные аминокислотные остатки двух центров связывания ингибиторов, один из которых расположен в бэта-слое, второй – в альфа-спиральном домене.

участвуют 15 аминокислотных остатков димерного интерфейса HUSpm и 19 – в случае HUMgal. Распределение этих остатков по элементам вторичной структуры микоплазменных HU-белков показано на рис. 2, а количество ингибиторов, в связывании которых участвуют эти остатки, показано в табл. 3.

Анализ аминокислотного окружения ингибиторов показал, что в димерных интерфейсах обоих HU-белков можно выделить два центра связывания. Один из них находится в междимерном бэта-листе, его основой являются аминокислотные остатки I46, F49, F52 (HUSpm) и L50, I53 (HUMgal). Остатки F49, F52 белка HUSpm и I53 – HUMgal участвуют в формировании ДС, последовательность которого была использована в качестве мишени докинга. В случае HUMgal, как отмечено выше, последовательность ДС сильно вырождена. В ней присутствует только один из двух консервативных остатков фенилаланина, формирующих стэкинг-взаимодействия, играющий важную роль в поддержании стабильности димерного интерфейса [6]. Отсутствие канонического ДС компенсируется в HUMgal участием в формировании междимерного бэта-листа неконсервативной аминокислотной последовательности, присутствующей в N-концевой области белка [12, 21]. Аминокислотные остатки L7 и A9 из N-концевой области HUMgal также участвуют в связывании ингибиторов (табл. 3).

Второй центр связывания ингибиторов находится в альфа-спиральном домене и его основой являются аминокислотные остатки первой и второй альфа-спиралей: L6, V30, F31, I34 (HUSpm) и Y12, L34, Q35 (HUMgal) (рис. 2, табл. 3). В HUSpm этот центр полностью гидрофобный, а в HUMgal в нем присутствуют две полярные аминокислоты, что и создает предпосылки для формирования не только гидрофобных, но и полярных контактов между белком и лигандом. В [22] показано, что у представителей семейства IHF, близкородственного HU-белкам, в димерном интерфейсе помимо ДС есть второй центр гидрофобных взаимодействий, расположенный в альфа-спиральном

Таблица 3. Два центра связывания ингибиторов в димерном интерфейсе микоплазменных HU-белков, выявленные при анализе аминокислотного окружения лигандов, найденных в базе данных Mscule

HU	3D ¹			альфа-1		альфа-2					бэта-1				петля			b2	бэта-3				
		№ А.о.	А.о.	Число лигандов ²	6	10	27	29	30	31	34	46	47	48	49	52	79	81	87				
Spm	№ А.о.			6	10	27	29	30	31	34		46	47	48	49	52	79	81	87				
	А.о.			L	I	T	F	V	F	I		I	A	G	F	F	A	F	L				
	Число лигандов ²			8	4	1	1	8	10	7		8	2	2	10	7	1	2	1				
HU	3D ¹	бэта-0	альфа-1	альфа-2							бэта-1				петля			b2	бэта-3				
				№ А.о.	А.о.	Число лигандов ²	31	34	35	37	38	41	47	48	49	50	51	52	53	56	85	91	
Mgal	№ А.о.	7	9	12		31		34	35	37	38	41	47	48	49	50	51	52	53	56		85	91
	А.о.	L	A	Y		V		L	Q	V	L	E	E	V	R	L	F	D	I	F		L	L
	Число лигандов ²	3	3	9		5		9	10	4	3	3	1	3	1	10	5	3	8	3		4	2

¹ Элементы вторичной структуры, к которым относятся указанные аминокислотные остатки (а.о.).

² Число лигандов из 10 отобранных, образующих контакты с указанными а.о. А.о., составляющие основы двух центров связывания ингибиторов, выделены серым фоном.

домене и необходимый для формирования димерного контакта.

Таким образом, установлено, что ингибиторы, мишенью которых является последовательность димеризационного сигнала HU-белков, имеют второй центр связывания, находящийся в альфа-спиральном домене, который может быть как полностью гидрофобным (HUSpm), так и содержать полярные аминокислотные остатки (HUMgal). При этом детерминанты связывания практически идентичны и не зависят от различий в аминокислотных последовательностях микоплазменных HU-белков. Следовательно, аналогично белкам INF HU-белки могут иметь два центра формирования димерного интерфейса: один – в междимерном бэта-листе, второй – в альфа-спиральном домене, и этот факт следует учитывать при создании ингибиторов HU-белков, мишенью которых является димерный интерфейс.

Работа выполнена при финансовой поддержке НИЦ “Курчатовский институт” (приказ № 1606).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dillon S.C., Dorman C.J.* // Nature Rev. Microbiol. 2010. V. 8. P. 185.
2. *Kamashev D.E., Agapova Y.K., Rastorguev S. et al.* // PLoS One. 2017. V. 12(11). P. e188037
3. *Bhowmick T., Ghosh S., Dixit K.* // Nature Commun. 2014. V. 5. P. 4124.
4. *Micka B., Marahiel M.A.* // Biochimie. 1992. V. 74. P. 641.
5. *Glass J.I., Assad-Garcia N., Alperovich N. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2006. V. 103. P. 425.
6. *Christodoulou E., Rypniewski W.R., Vorgias C.R.* // Extremophiles. 2003. V. 7. P. 111.
7. *Boyko K.G., Rakitina T.V., Korzhenevskiy D.A. et al.* // Acta Cryst. F. 2015. V. 71. P. 24.
8. *Бойко К.М., Тимофеев В.И., Самыгина В.Р. и др.* // Кристаллография. 2016. Т. 61. № 5. С. 691.
9. *Николаева А.Ю., Тимофеев В.И., Бойко К.М.* // Кристаллография. 2015. Т. 60. № 6. С. 922.
10. *Алтухов Д.А., Агапова Ю.К., Власкина А.В. и др.* // Вестн. МГУ. 2016. Т. 57. № 4. С. 226.
11. *Boyko K.M., Gorbacheva M.A., Rakitina T.V. et al.* // Sci. Rep. 2016. V. 3. P. 36366.
12. *Altukhov D.A., Talyzina A.A., Agapova Y.K. et al.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2016. V. 36. P. 45.
13. *Timofeev V.I., Altukhov D.A., Talyzina A.A.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2018. P. 1.
14. *Талызина А.А., Агапова Ю.К., Подшивалов Д.Д. и др.* // Кристаллография. 2017. Т. 62. № 6. С. 917.
15. *Webb B., Sali A.* // Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. Current Protocols in Bioinformatics, 2014 John Wiley & Sons, Inc., 5.6.1–5.6.32.
16. *Trott O., Olson A.J.* // J. Comput. Chem. 2010. V. 31. P. 455.
17. *Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W. et al.* // Adv. Drug. Del. Rev. 2001. V. 46. № 1–3. P. 3.
18. *Trott O., Olson A.J.* // J. Comput. Chem. 2010. V. 31. P. 455.
19. *Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B. et al.* // J. Comput. Chem. 2005. V. 26. P. 1701.
20. *Ligplot-Wallace A.C., Laskowski R.A., Thornton J.M.* // Protein Eng. 1996. V. 8. P. 127
21. *Kamashev D., Oberto J., Serebryakova M. et al.* // Biochemistry. 2011. V. 50. P. 8692.
22. *Dey D., Nagaraja V., Ramakumar S.* // Mol. Phylogenet. Evol. 2017. V. 107. P. 356.