

## СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 538.911

### ИНГИБИТОР, НАЦЕЛЕННЫЙ НА ГРАНИЦУ МЕЖДУ МОНОМЕРАМИ БЕЛКА HU ИЗ *Spiroplasma Melliferum*, НАРУШАЕТ КОНФОРМАЦИОННУЮ ДИНАМИКУ И ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА БЕЛКА

© 2020 г. Ю. К. Агапова<sup>1,\*</sup>, Д. А. Алтухов<sup>1</sup>, Д. Э. Камашев<sup>2,3</sup>, В. И. Тимофеев<sup>1,4</sup>, Е. В. Смирнова<sup>3</sup>,  
Т. В. Ракитина<sup>1,3,\*\*</sup>

<sup>1</sup> Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий,  
Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России,  
Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

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

\*E-mail: agarova.jk@gmail.com

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

Поступила в редакцию 03.06.2020 г.

После доработки 03.06.2020 г.

Принята к публикации 10.06.2020 г.

Гистоноподобные HU-белки являются глобальными регуляторами топологии бактериального генома и участвуют в регуляции транскрипции. Они необходимы для выживания простейших микроорганизмов класса *Mollicutes*, ряда патогенных бактерий, включая *Mycobacterium tuberculosis* и *Streptococcus pneumoniae*, и являются перспективной мишенью для разработки новых антибиотиков. Однако конкурентное ингибирование ДНК-связывающей способности HU-белков малоэффективно из-за высокой подвижности и большого размера ДНК-связывающего сайта. Поэтому использован альтернативный подход, основанный на поиске молекул, взаимодействующих с границей между двумя мономерами. Пространственная структура HU-белка из *Spiroplasma melliferum* (HUSpm) использована в качестве мишени для виртуального скрининга химической библиотеки, а также для моделирования комплекса HUSpm с ингибитором. Анализ молекулярно-динамической траектории, полученной для комплекса HUSpm–ингибитор, подтвердил, что связывание ингибитора на границе между мономерами приводит к нарушению конформационной динамики в области ДНК-связывающего домена. С помощью метода торможения в геле показано, что ингибитор действительно нарушает ДНК-связывающие свойства белка, что указывает на перспективность использования предложенного подхода.

DOI: 10.31857/S0023476120060041

#### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что белковая кристаллография и рентгеноструктурный анализ активно используются для создания таргетных, направленных на определенную белковую мишень, лекарств. В данном процессе используют методы виртуального скрининга и молекулярного докинга, а также пространственную структуру белка-мишени, полученную с высоким разрешением [1, 2]. Кроме того, чтобы подтвердить взаимодействие найденной *in silico* молекулы с белком-мишенью, проводят кристаллизацию белка в комплексе с ингибитором. Если закристаллизовать комплекс не удастся, то используют методы моделирования и молекулярной динамики (МД). На основании структурных данных, полученных для белка-ми-

шени в свободной форме, сначала моделируют комплекс белка с ингибитором, а затем анализируют поведение комплекса с помощью МД-эксперимента.

Данная работа является наглядным примером использования описанного выше подхода для разработки химических ингибиторов гистоноподобных HU-белков, которые являются глобальными регуляторами топологии бактериального генома [3]. Ингибиторы HU-белков могут стать основой для получения новых антибиотиков [4]. Гистоноподобные HU-белки выполняют свою функциональную роль путем связывания и избирания геномной ДНК бактерий [5]. Они участвуют в регуляции транскрипции и, как следствие, транскриптомного и протеомного профиля бак-

териальной клетки [6]. HU-белки необходимы для выживания простейших микроорганизмов класса *Mollicutes* [7], а также ряда других патогенных бактерий, включая *Mycobacterium tuberculosis* [8] и *Streptococcus pneumoniae* [9].

Ранее найденные ингибиторы ДНК-связывающей способности HU-белков были направлены на ДНК-связывающий сайт [4]. Однако большой размер и подвижность ДНК-связывающего сайта, а также высокая аффинность HU-белков к ДНК существенно затрудняли поиск таких ингибиторов. Поэтому в данной работе использовали альтернативный подход, основанный на поиске молекул, взаимодействующих с границей между двумя мономерами HU-белка. Перспективность данного подхода и его преимущества по сравнению с разработкой ингибиторов, направленных на ДНК-связывающий сайт, была исследована ранее [10, 11].

Пространственная структура HU-белка из *Spiroplasma melliferum* (HUSpm) (PDB ID 5L8Z), полученная на синхротронном источнике НИЦ “Курчатовский институт” с разрешением 1.36 Å [12, 13], была использована в качестве мишени для виртуального скрининга химической библиотеки компании Vitas-M laboratory (<https://vitasmlab.biz/>), содержащей 1400000 соединений. Способность выявленных соединений подавлять ДНК-связывающую способность HUSpm была исследована *in vitro* методом торможения в геле [5]. Комплекс найденного ингибитора с HUSpm построен и изучен в МД-эксперименте, параметры которого были подобраны ранее при исследовании конформационной динамики микоплазменных HU-белков в свободной форме [14, 15].

Анализ МД-траектории показал, что связывание ингибитора в межграницной области димеров приводит к изменению конформационной динамики ДНК-связывающего домена, что в свою очередь влияет на эффективность ДНК-связывания. Снижение эффективности ДНК-связывания приводит к нарушению нормального функционирования HU-белка. Данный подход может быть использован при разработке низкомолекулярных ингибиторов целого ряда ДНК-связывающих мультимерных белков.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Виртуальный скрининг химической библиотеки.* В качестве мишени для поиска химических ингибиторов, направленных на границу между двумя мономерами HU-белка, выбрана пространственная структура HUSpm (PDB ID 5L8Z), полученная методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 1.36 Å [12, 13]. Библиотека химических соединений, содержащая 1400000 молекул, была получена от компании VitasM laboratories

(<http://www.vitasmlab.com/>). Основные этапы скрининга: подготовка мономера HUSpm, скрининг библиотеки и структурная фильтрация результатов. Для моделирования по гомологии неразрешенных участков белка использовали программу Modeller [16], для оптимизации боковых радикалов – программу Mutate [17]. Молекулярный докинг проводили с помощью программы LeadFinder [18], структурную фильтрацию – с помощью программы dock\_filter [19]. Визуализацию результатов моделирования проводили в программе VMD [20].

*Валидация результатов виртуального скрининга методом торможения в геле.* Метод основан на разности молекулярных масс комплекса белок–ДНК и свободной ДНК, которая обуславливает различную подвижность в не денатурирующем полиакриламидном геле при проведении электрофореза. При проведении анализа использовали два микоплазменных HU-белка HUSpm и HU-белок *Mycoplasma gallisepticum* (HUMgal), полученные как описано в [13, 21, 22], а также короткий двухцепочечный олигонуклеотидный дуплекс, полученный из олигонуклеотидов CrJ\_A3 (5'-Cy3-CCGTCGTAGCAA GAAAGACTCAACT-GCACT-3') и cr\_D (5'-AGTGCAGTTGAGTCCTTGCTACGACGG-3'), Cy3 – флуоресцентная метка.

Электрофорез проводили в не денатурирующем полиакриламидном 10%-ном геле и 100 мМ Трис-боратном буфере. Детекцию результатов проводили на BIO RAD Faros FX Molecular Imager (532 nm EX, 605 nm BP), а анализ результатов с помощью программ Quantity One и GraphPad Prism 5.

*Моделирование комплекса ингибитора с димером HUSpm и его исследование с помощью методов молекулярной динамики.* Приготовление ДНК-белкового комплекса осуществляли с помощью интерактивной графической программы COOT [23]. Модель HUSpm была наложена на структуру HU-белка *Borrelia burgdorferi* в комплексе с ДНК (PDB ID 2NP2) [24], координаты ДНК были перенесены на модель HUSpm. После этого провели замену и удаление избытка олигонуклеотидов.

Параметризацию ингибитора проводили при помощи программного пакета ASPYPE [25].

Полученные комплексы изучены в МД-эксперименте. Для проведения МД-расчетов использовали программный пакет GROMACS [26]. В качестве силового поля выбрано поле AMBER99SB [27]. Комплексы были помещены в кубическую ячейку, заполненную водой с добавлением ионов в количестве, необходимом для того, чтобы суммарный заряд систем оставался нулевым. В качестве модели молекулы воды выбрана TIP3P.

На первом этапе МД-эксперимента провели минимизацию энергии комплекса для релаксации любых возможных искажений. Затем на по-

движность атомов системы были наложены ограничения, при помощи симуляции системы в баростате и термостате установлены температура в 300 К и давление 1 атм. После снятия всех ограничений провели МД-эксперимент, параметры которого представлены в табл. 1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

HU-белки представляют собой димеры. Каждый мономер в димере можно разделить на два домена:  $\alpha$ -спиральный димеризационный домен и  $\beta$ -ленточный седлообразный ДНК-связывающий домен (рис. 1). В ДНК-связывающем домене можно выделить подвижные в отсутствие ДНК “руки”, состоящие из  $\beta$ -слоев 4 и 5 и примыкающих к ним петель, и стабильную ДНК-связывающую платформу, включающую в себя  $\beta$ -слои 3 и 6 и  $\alpha$ -спираль 3, тогда как  $\beta$ -слой 2 и петля между  $\beta$ -слоями 2 и 3 участвуют в формировании границы между мономерами [5, 14, 15].

Целью работы был поиск ингибиторов, взаимодействующих с границей между двумя мономерами. В связи с прочностью границы HUSpm [13] из результатов виртуального скрининга и докинга отобрали соединения, прочность связывания которых превосходила 10 ккал/моль. В результате анализа отобрали четыре молекулы, для которых структуры предсказанных комплексов не имели стерических ограничений. Структурные формулы потенциальных ингибиторов представлены на рис. 2, а энергия их связывания с белком в табл. 2.

Все потенциальные ингибиторы протестировали на способность ингибировать ДНК-связывающую HUSpm с помощью метода торможения в геле (рис. 3). Как видно из рисунка, только соединение STK368440 обладало ингибирующей способностью в концентрации 100 мкМ и было использовано для получения кривой дозовой за-

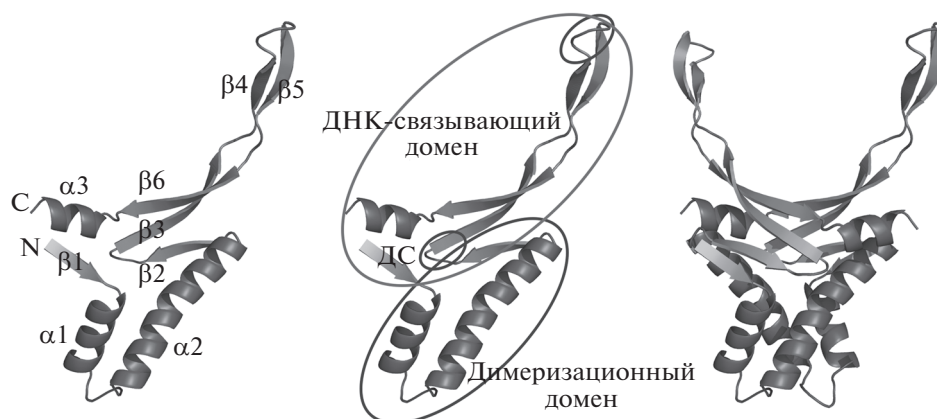
**Таблица 1.** Параметры молекулярно-динамического эксперимента

Система в термостате	
Термостат	Berendsen
$T$ , К	300
Система в баростате	
Баростат	Parrinello-Rahman
Устанавливаемое давление, атм	1
$T$ , К	300
Продолжительность NVT- и NPT-динамики, пс	100
Шаг временной сетки, пс	0.002
Молекулярная динамика	
Шаг временной сетки $dt$ , пс	0.002
Количество шагов	50000000
Длина траектории, нс	100
Интегратор	Leap-frog

**Таблица 2.** Соединения из коллекции VitasM laboratories (<http://www.vitasmlab.com/>), отобранные при виртуальном скрининге, и расчетные энергии связывания

Панель на рис. 2	Номер в коллекции	$\Delta G_{\text{calc}}$ , ккал/моль
А	STK045088	-10.69
Б	STK125332	-10.72
В	STK368440	-10.29
Г	STK888563	-10.43

висимости и определения концентрации полумаксимального ингибирования ( $KI_{50}$ ), снижающей эффективность связывания белка с ДНК на 50% (рис. 3б–3г). В данном эксперименте инги-



**Рис. 1.** Модели мономера и димера HUSpm. На левой панели показаны элементы вторичной структуры, в центре – разделение мономера на домены. Окружностями обозначены функционально важные участки белка: димеризационный сигнал (ДС) и петля, интеркалирующая в малую бороздку ДНК.

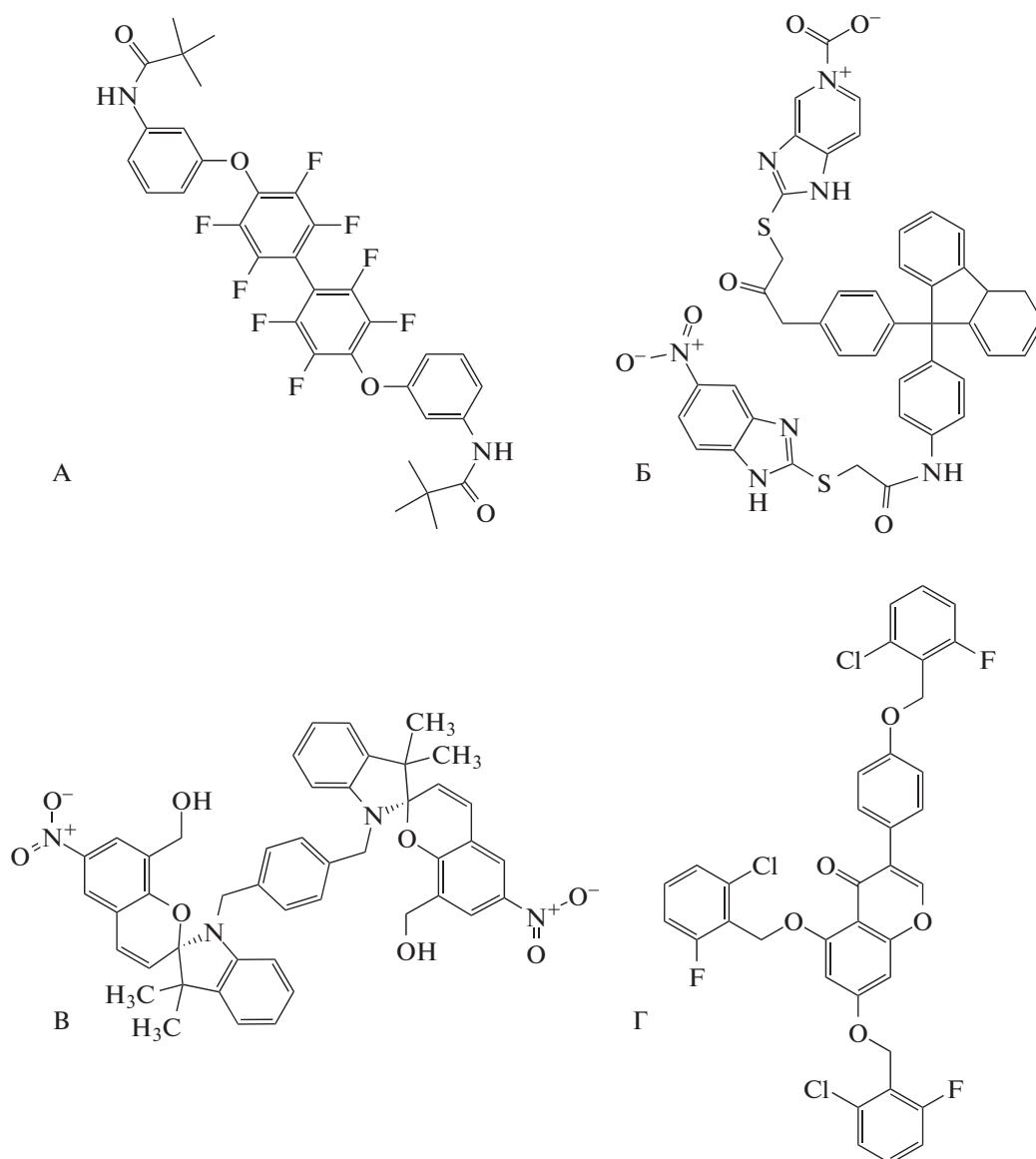


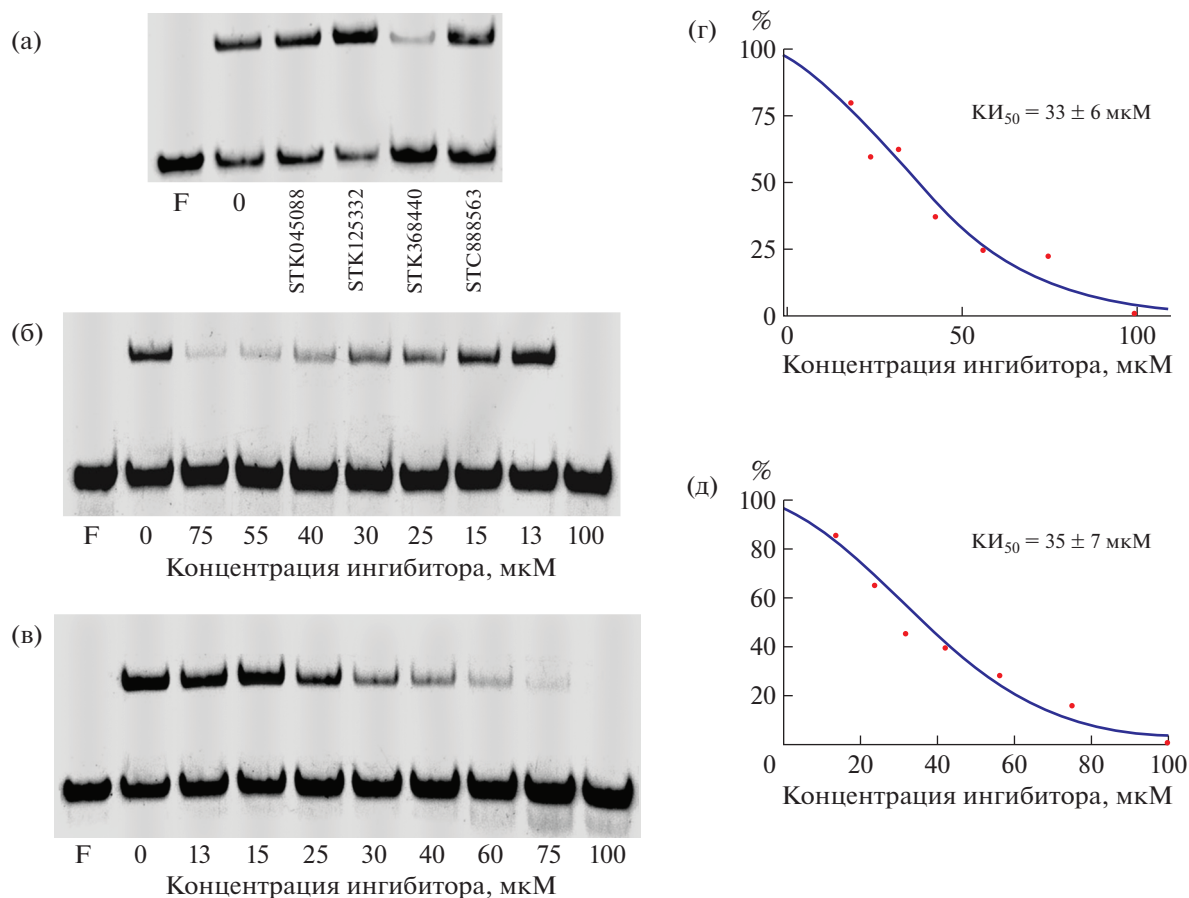
Рис. 2. Соединения из коллекции VitasM laboratories (<http://www.vitasmlab.com/>), отобранные при виртуальном скрининге.

бирующую способность STK368440 исследовали в отношении двух микоплазменных белков HUSpm и HUMgal, полученные  $KI_{50}$  составляли  $33 \pm 6$  и  $35 \pm 7$  мкМ для HUSpm и HUMgal соответственно.

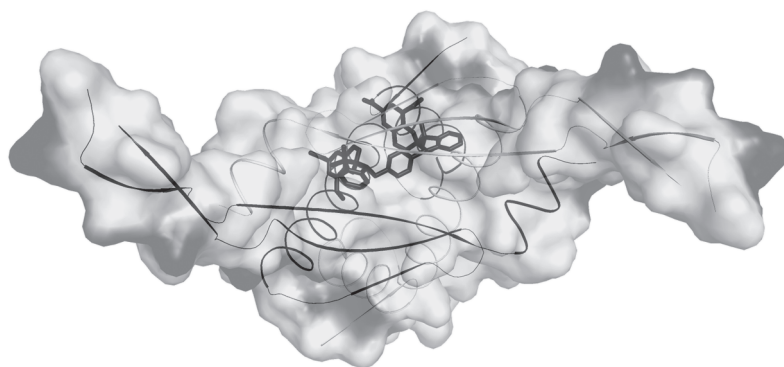
Несмотря на большой предварительный опыт кристаллизации HU-белков [12, 21, 28], в настоящей работе не удалось получить кристаллы комплексов HUSpm с STK368440, поэтому для исследования взаимодействия ингибитора с белком использовали методы моделирования и молекулярной динамики. Модель STK368440 на границе между двумя мономерами HUSpm представлена на рис. 4. МД-симуляция этой модели, с одной стороны, позволяла оценить устойчивость комплекса, а с другой стороны, узнать, как меняется

конформационная динамика белка-мишени после связывания ингибитора.

Был проведен анализ флуктуаций основной цепи HUSpm в свободном виде, в комплексе с модельной ДНК и в комплексе с ингибитором STK368440, наблюдаемых при 100 нс МД-симуляциях (рис. 4). Как видно из рисунка, в свободном HUSpm ДНК-связывающий домен, особенно его участок между  $\beta 3$ - и  $\beta 6$ -слоями, обладает значительной подвижностью. Именно такое поведение HU-белков в растворе наблюдалось при их исследованиях с помощью ЯМР-спектроскопии [14, 15]. В комплексе с ДНК подвижность ДНК-связывающего домена уменьшается на всем его протяжении (от  $\beta 2$ -слоя до С-концевой  $\alpha 3$ -



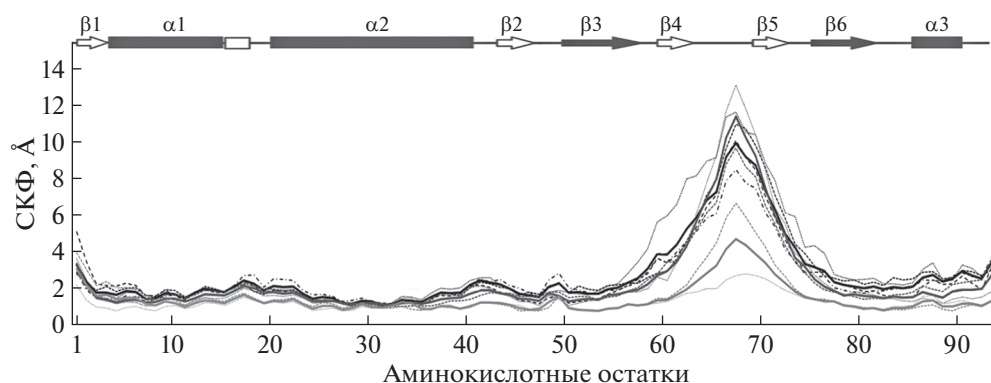
**Рис. 3.** Влияние соединений, отобранных при виртуальном скрининге, на ДНК-связывающую способность HU-белков, определенное методом торможения в геле: а – эффект 100 мкМ концентрации соединений на ДНК-связывающую способность HUSpm; б–д – концентрационные зависимости эффективности ингибирования ДНК-связывания соединением STK368440 (б, в), кривые дозовой зависимости и концентрации полумаксимального ингибирования ( $KI_{50}$ ) (г, д), полученные для HUSpm (б, г) и HUMgal (в, д). F – свободная ДНК.



**Рис. 4.** Модель ингибитора STK368440, взаимодействующего с границей между двумя мономерами в области перехода  $\alpha$ -спирального домена в ДНК-связывающий. Белок показан как заряженная поверхность с элементами вторичной структуры.

спирали). Это происходит из-за перехода молекулы в конформацию захвата ДНК, в которой подвижные  $\beta$ -ленточные “руки” обхватывают ДНК,

а петля между  $\beta$ 4- и  $\beta$ 5-слоями интеркалирует в малую бороздку двойной спирали [24]. При взаимодействии с ингибитором наблюдается увеличе-



**Рис. 5.** Среднеквадратичная флуктуация (СКФ в Å)  $\alpha$ -атомов в течение 100 нс МД-симуляции, вычисленная для свободного HUSpm (темно-серые линии), HUSpm в комплексе с модельной ДНК (светло-серые линии) и в комплексе с ингибитором STK368440 (черные линии). Разрывными линиями показаны результаты независимых МД-экспериментов, сплошными – усредненные значения. Вторичная структура HUSpm, взятая из [15], показана сверху.

ние подвижности в области перехода  $\alpha$ -спирального домена в ДНК-связывающий домен (предполагаемое место связывания ингибитора), а также в наиболее стабильных областях ДНК-связывающего домена ( $\beta 3$ -,  $\beta 6$ -слой и  $\alpha 3$ -спираль), которые обеспечивают адаптацию седловидной основы ДНК-связывающего домена при переходе белка из свободного состояния в конформацию захвата ДНК, что предположительно обеспечивает высокую прочность ДНК-белковых комплексов (константы диссоциации в наномолярной области) [5]. Наблюдаемое нарушение конформационной динамики сопровождается нарушением ДНК-связывающей способности (рис. 5), что подтверждает предположение о возможности контролировать ДНК-связывающие свойства HU-белков путем воздействия на границу между мономерами.

Вероятно, подобный подход может быть использован при разработке низкомолекулярных ингибиторов, специфичных к другим нуклеоид-ассоциированным белкам, которые вместе с белком HU поддерживают топологию бактериального генома.

Работы в части исследования комплексов HU-белков с ингибиторами выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-01001), в части поиска ингибиторов – Программы президенту РАН “Молекулярная и клеточная биология” (грант № 0101-2014-0086). Технология проведения МД-экспериментов разработана при поддержке НИЦ “Курчатовский институт” (приказ № 1363 от 25.06.2019), поиск условий кристаллизации комплексов проводили при частичной поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Drews J. // Science. 2000. V. 287. P. 1960.
2. Anderson A. // Chem. Biol. 2003. V. 10. P. 787.
3. Stojkova P., Spidlova P., Stulik J. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2019. V. 9. P. 159.
4. Bhowmick T., Ghosh S., Dixit K. // Nature Commun. 2014. V. 5. P. 4124.
5. Kamashev D.E., Agapova Y.K., Rastorguev S. et al. // PLOS. 2017. V. 12. P. e188037.
6. Камашев Д.Э., Ракитина Т.В., Матюшкина Д.С. и др. // Биоорган. химия 2019. Т. 45. С. 524.
7. Glass J.I., Assad-Garcia N., Alperovich N. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 425.
8. Griffin J.E., Jeffrey, Gawronsk D. et al. // PLoS Pathog. 2011. V. 7. P. e1002251.
9. Ferrándiz M.-J., Carreño D., Ayora S. et al. // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 493.
10. Талызина А.А., Агапова Ю.К., Подшивалов Д.Д. и др. // Кристаллография. 2017. Т. 62 С. 903.
11. Agapova Y.K., Talyzina A.A., Altukhov D.A. et al. // Crystallography reports. 2019. V. 64. P. 602.
12. Boyko K.G., Rakitina T.V., Korzhenevskiy D.A. et al. // Acta Cryst. F. 2015. V. 71. P. 24.
13. Boyko K.M., Gorbacheva M.A., Rakitina T.V. et al. // Sci Rep. 2016. V. 3 P. 36366.
14. Altukhov D.A., Talyzina A.A., Agapova Y.K. et al. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2016. V. 36. P. 45.
15. Timofeev V.I., Altukhov D.A., Talyzina A.A. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2018. V. 36. P. 4392.
16. Sali A., Blundell T.L. // J. Mol. Biol. 1993. V. 234. P. 779.
17. Строганов О.В., Чилов Г.Г., Новиков Ф.Н. и др. // Программа Mutate. 2011. р. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ 2011615051.
18. Stroganov O.V., Novikov F.N., Stroylov V.S. et al. // J. Chem. Inf. Model. 2008. V. 48. P. 2371.

19. *Novikov F.N., Stroylov V.S., Stroganov O.V. et al.* // J. Mol. Model. 2010. V. 16. P. 1223.
20. *Humphrey W., Dalke A., Schulten K.* // J. Mol. Graph. 1996. V. 14. P. 33.
21. *Николаева А.Ю., Тимофеев В.И., Бойко К.М. и др.* // Кристаллография. 2015. Т. 60. С. 922.
22. *Алтухов Д.А., Агапова Ю.К., Власкина А.В. и др.* // Вестн. МГУ. 2016. Т. 57. С. 226.
23. *Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G. et al.* // Acta Cryst. D 2010. V. 66. P. 486.
24. *Mouw K.W., Rice P.A.* // Mol. Microbiol. 2007. V. 63. P. 1319.
25. *Trott O., Olson A.J.* // J. Comput. Chem. 2010. V. 31. P. 455.
26. *Abraham R.G., Tanvir I N.R., Santiago B.X. et al.* // SoftwareX. 2015. P. 19.
27. *Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B. et al.* // J. Comput. Chem. 2005. V. 26. P. 1701.
28. *Бойко К.М., Тимофеев В.И., Самыгина В.Р. и др.* // Кристаллография. 2016. Т. 61. С. 691.