

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^{1,*}, Д. А. Алтухов¹, Д. Э. Камашев^{2,3}, В. И. Тимофеев^{1,4}, Е. В. Смирнова³,
Т. В. Ракитина^{1,3,**}

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

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

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

⁴ 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-

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: α -спиральный димеризационный домен и β -ленточный седлообразный ДНК-связывающий домен (рис. 1). В ДНК-связывающем домене можно выделить подвижные в отсутствие ДНК “руки”, состоящие из β -слоев 4 и 5 и примыкающих к ним петель, и стабильную ДНК-связывающую платформу, включающую в себя β -слои 3 и 6 и α -спираль 3, тогда как β -слой 2 и петля между β -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	ΔG_{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.

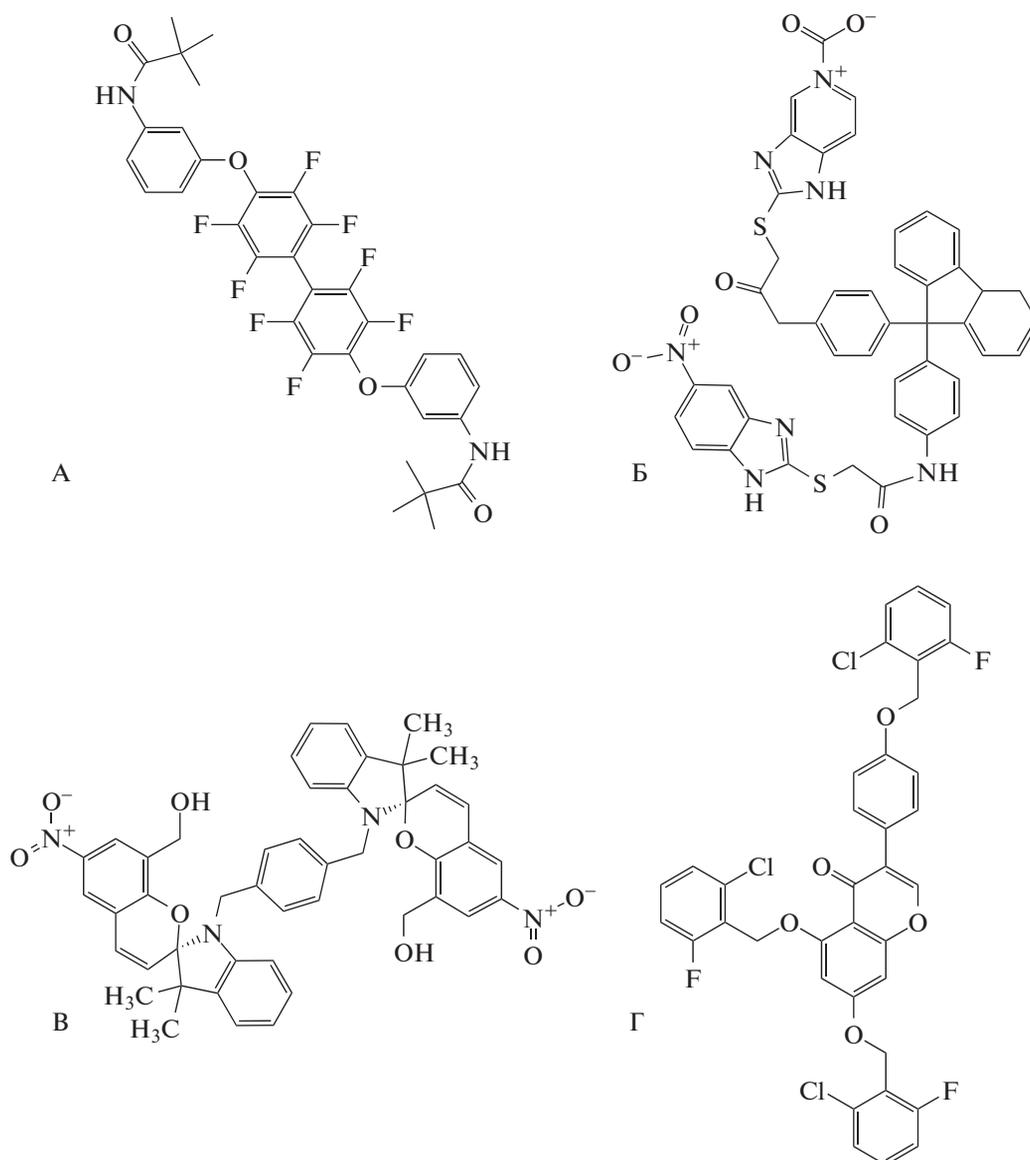


Рис. 2. Соединения из коллекции VitasM laboratories (<http://www.vitasmlab.com/>), отобранные при виртуальном скрининге.

бирующую способность STK368440 исследовали в отношении двух микоплазменных белков HUSpm и HUMgal, полученные KI_{50} составляли 33 ± 6 и 35 ± 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 $\alpha 3$ -

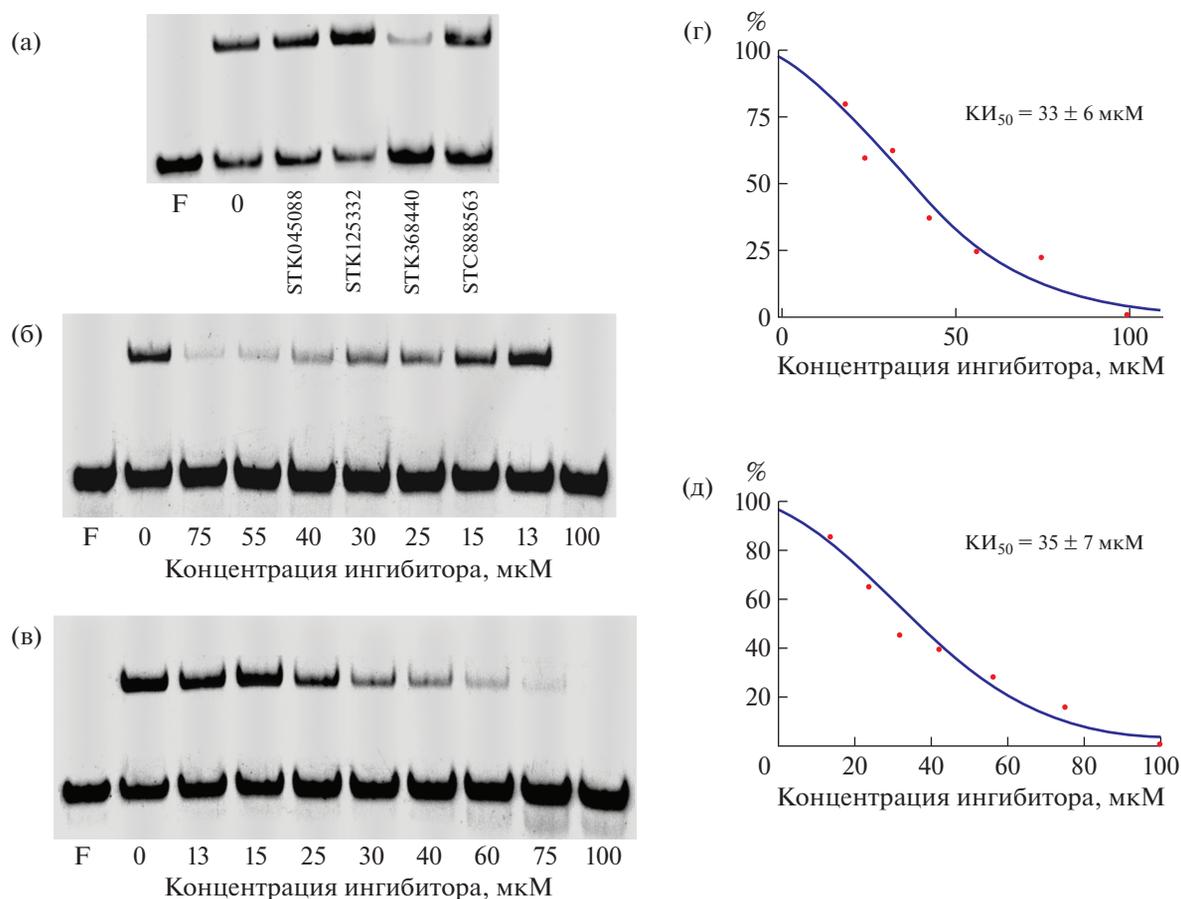


Рис. 3. Влияние соединений, отобранных при виртуальном скрининге, на ДНК-связывающую способность HU-белков, определенное методом торможения в геле: а – эффект 100 мкМ концентрации соединений на ДНК-связывающую способность HUSpm; б–д – концентрационные зависимости эффективности ингибирования ДНК-связывания 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.

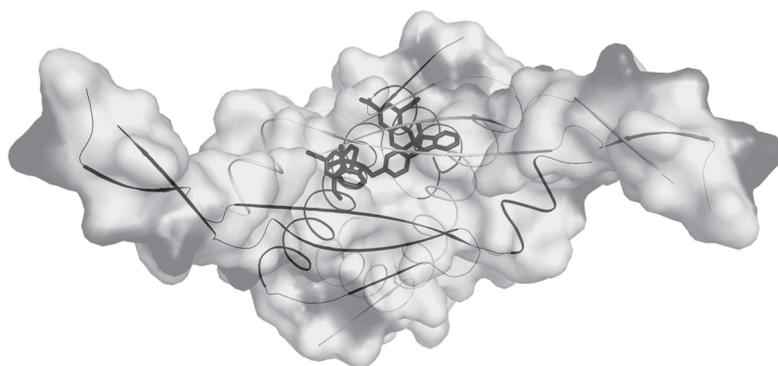


Рис. 4. Модель ингибитора STK368440, взаимодействующего с границей между двумя мономерами в области перехода α -спирального домена в ДНК-связывающий. Белок показан как заряженная поверхность с элементами вторичной структуры.

спирали). Это происходит из-за перехода молекулы в конформацию захвата ДНК, в которой подвижные β -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-

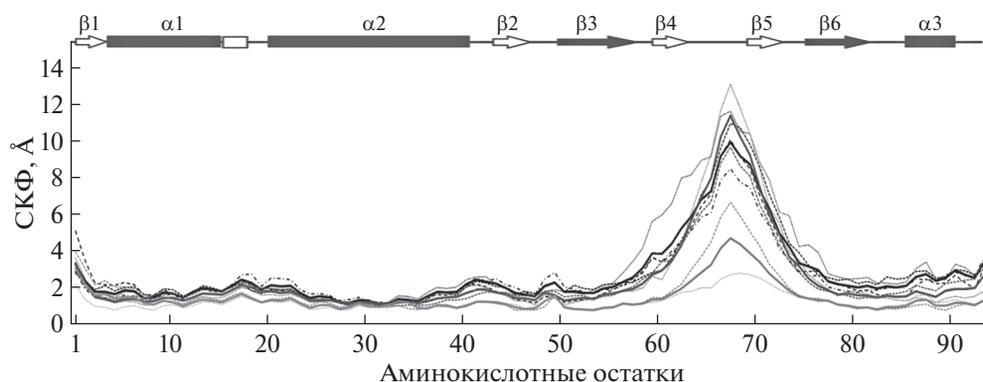


Рис. 5. Среднеквадратичная флуктуация (СКФ в Å) α -атомов в течение 100 нс МД-симуляции, вычисленная для свободного HUSpm (темно-серые линии), HUSpm в комплексе с модельной ДНК (светло-серые линии) и в комплексе с ингибитором STK368440 (черные линии). Разрывными линиями показаны результаты независимых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

ние подвижности в области перехода α -спирального домена в ДНК-связывающий домен (предполагаемое место связывания ингибитора), а также в наиболее стабильных областях ДНК-связывающего домена (β 3-, β 6-слой и α 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. Строгонов 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.