

УДК 538.911

ВЛИЯНИЕ НАРУШЕНИЯ ГРАНИЦЫ МЕЖДУ МОНОМЕРАМИ В ДИМЕРЕ НА СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА HU-БЕЛКА ИЗ *SPIROPLASMA MELLIFERUM*

© 2021 г. А. С. Комолов^а, Ю. К. Агапова^{а, *}, В. И. Тимофеев^{а, b}, Т. В. Ракитина^{а, c}

^аНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”,
Москва, 123182 Россия

^bИнститут кристаллографии им. А.В. Шубникова
ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, 119333 Россия

^cИнститут биоорганической химии им. академиком
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

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

Поступила в редакцию 26.12.2020 г.

После доработки 22.01.2021 г.

Принята к публикации 27.01.2021 г.

Исследовано влияние замен аминокислотных остатков, формирующих границу между мономерами в димере HU-белка из *Spiroplasma melliferum* (HUSpm), на стабильность и конформационную динамику молекулы. Методом молекулярной динамики изучено поведение одиночных и множественных мутантов HUSpm. Моделирование осуществляли с использованием программного пакета GROMACS, в качестве силового поля использовали OPLS. Для каждого мутанта проведена полноатомная симуляция продолжительностью 50 нс. Полученные данные показали, что нарушения границы между мономерами в области альфа-спирального домена увеличивают подвижность молекулы в области ДНК-связывающего домена.

Ключевые слова: гистоноподобные белки, HU-белки, структурный анализ, межмолекулярные контакты, стэкинг-взаимодействия, молекулярная динамика, конформационная динамика.

DOI: 10.31857/S1028096021100083

ВВЕДЕНИЕ

ДНК-связывающие гистоноподобные белки бактерий (HU-белки) относятся к семейству белков, ассоциированных с нуклеоидом (NAP – nucleoid-associated protein); они участвуют в поддержании суперскрученности и компактизации геномной ДНК прокариотической клетки, а также в регуляции основных ДНК-зависимых процессов [1] и поддержании транскриптомного и протеомного профиля бактериальной клетки [2]. Гены HU-белков найдены во всех известных на сегодня бактериальных геномах [3]. В подавляющем большинстве бактерий HU-белки представляют собой гомодимеры размером около 20 кДа, состоящие из относительно стабильного альфа-спирального домена и ДНК-связывающего домена, подвижного в отсутствие ДНК [4, 5]. HU-белки критически важны для жизнеспособности микроорганизмов класса *Mollicutes* [6], а также ряда других беззачаточных бактерий [7] и, соответственно, являются перспективными мишенями для разработки антибактериальных препаратов [8–12].

На настоящий момент найдены низкомолекулярные ингибиторы HU-белков, действующие как на ДНК-связывающий домен [8, 9], так и на альфа-спиральный домен [10–12]. Их мишенью является граница между мономерами в димере, нарушение которого, предположительно, влияет на ДНК-связывающие свойства HU-белка и его способность выполнять свою биологическую функцию.

Целью работы было изучение влияния аминокислотных замен, нарушающих контакты между мономерами в димере HU-белка из микоплазм *Spiroplasma melliferum* (HUSpm), на конформационную динамику молекулы. Было исследовано поведение одиночных и множественных мутантов HUSpm в процессе полноатомной молекулярно-динамической симуляции продолжительностью 50 нс. Полученные данные показали, что нарушения границы между мономерами в димере приводит к увеличению подвижности молекулы в области ДНК-связывающего домена. Аналогичное изменение конформационной динамики наблюдалось при моделировании связывания би-

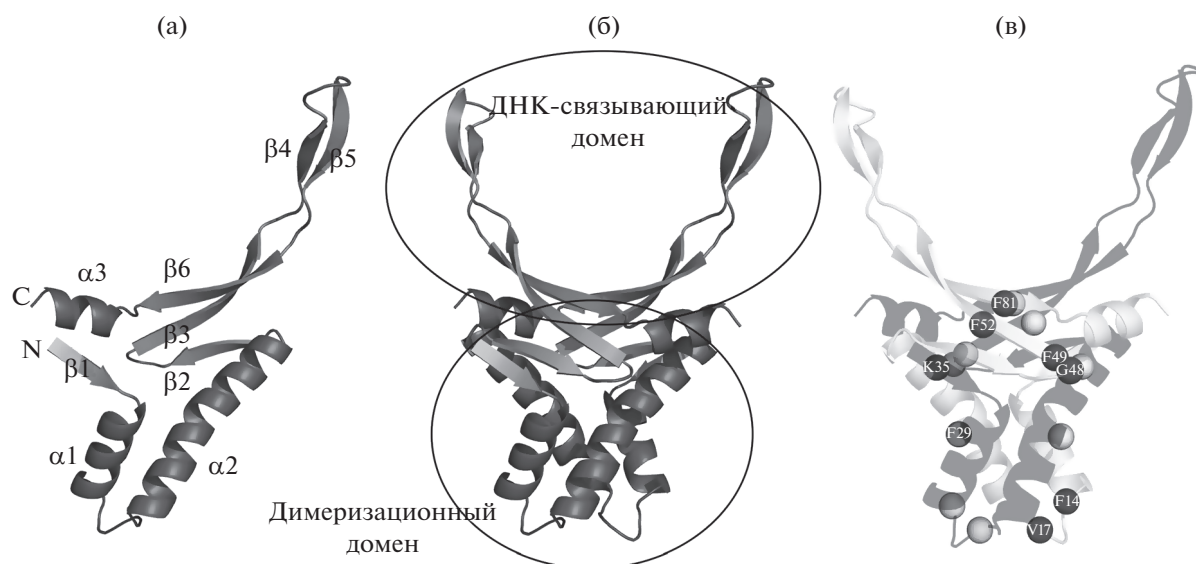


Рис. 1. Пространственная структура мономера и димера HUSpm: а – элементы вторичной структуры (показаны на мономере HUSpm); б – доменная организация белка (показана на димере HUSpm); в – два ароматических центра стэкинг-взаимодействий, расположенные на границе между мономерами в димере HU-белка. Аминокислотные остатки, выбранные для мутагенеза, подписаны на одном мономере.

сфенольных производных флуорена с альфа-спиральным доменом HUSpm [10].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выбор аминокислотных остатков для мутагенеза

В подавляющем большинстве бактерий HU-белки функционируют в виде гомодимеров, которые состоят из стабильного α -спирального (димеризационного) домена и более подвижного β -ленточного ДНК-связывающего домена (рис. 1а, 1б). В ДНК-связывающем домене можно выделить седлообразную ДНК-связывающую платформу (β -слои 2, 3 и 6, и α -спираль 3) и подвижные в отсутствие ДНК “руки”, состоящие из β -слоев 4 и 5 и примыкающих к ним петель. Все α -спирали и петля между β -слоями 2 и 3 участвуют в формировании межмолекулярных контактов [4, 5]. Анализ границы между мономерами в димере HUSpm, проведенный в [13, 14], выявил в нем два центра межмолекулярных стэкинг-взаимодействий между боковыми радикалами остатков фенилаланина. Один центр формируется между петлями, соединяющей β -слои 2 и 3, и α -спиралями 2 и 3, второй – между С-концевой частью α -спирали 1 и N-концевой частью α -спирали 2 [13] (рис. 1в). Эти центры вносят основной вклад в стабилизацию димеров HU-белков: один известен как сигнал димеризации [15], аминокислотные остатки другого являются структурными детерминантами термостабильности HUSpm [4]. Поэтому для изучения влияния нарушения границы между мономерами в димере на конформационную динамику ДНК-

связывающего домена были проведены единичные и множественные замены аминокислотных остатков (в первую очередь остатков фенилаланина), формирующих центры стэкинг-взаимодействий HUSpm: F49A, F52A + F81A и F29A, F29A + F14A + V17T, а также замена K35T, нарушающая межмолекулярную водородную связь K35-G48 и усиливающая чувствительность HUSpm к бисфенольным производным флуорена [10].

ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАНТНЫХ БЕЛКОВ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Модели мутантных белков были получены на основе кристаллической структуры HUSpm (PDB ID 5L8Z [16]) с помощью интерактивной графической программы COOT [17]. Для проведения молекулярно-динамических расчетов использовали программный пакет GROMACS [18]. В качестве силового поля было выбрано поле OPLS. 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 была выбрана TIP3P. На первом этапе молекулярно-динамического эксперимента была проведена минимизация энергии комплекса для релаксации любых возможных искажений. Затем на подвижность атомов системы были наложены ограничения, и при помощи моделирования системы в баростате и термостате были установлены температура 300 К и давление 1 атм. После снятия всех ограничений был проведен молекулярно-динамический экс-

Таблица 1. Протокол молекулярно-динамического эксперимента

Система в термостате	
Термостат	Берендсена
Температура, К	300
Продолжительность NVT динамики, пс	100
Шаг временной сетки, пс	0.001
Система в баростате	
Баростат	Паринелло–Рахмана
Устанавливаемое давление, атм.	1
Температура, К	300
Продолжительность NPT динамики, пс	100
Шаг временной сетки, пс	0.001
Продуктивная молекулярная динамика	
Шаг временной сетки dt , пс	0.002
Количество шагов	25000000
Длина траектории, нс	50
Интегратор	Стохастический динамический алгоритм “Leap-frog”

перимент, параметры которого представлены в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Был проведен сравнительный анализ флуктуаций $\text{C}\alpha$ -атомов основной цепи, наблюдаемых при молекулярно-динамических симуляциях в течение 50 нс HUSpm дикого типа, и мутантных вариантов белка, в которых аминокислотные замены приводили к нарушениям межмолекуляр-

ных взаимодействий в области границы между мономерами в димере (рис. 2). Мутациям подвергались аминокислотные остатки, играющие ключевую роль в стабилизации димера HUSpm [4, 13] (рис. 1в). Одна из исследуемых мутаций также усиливала ингибирующий эффект бисфенольных производных флуорена на ДНК-связывающую способность HUSpm [10].

Рис. 2 иллюстрирует конформационную динамику HUSpm дикого типа, характерной особен-

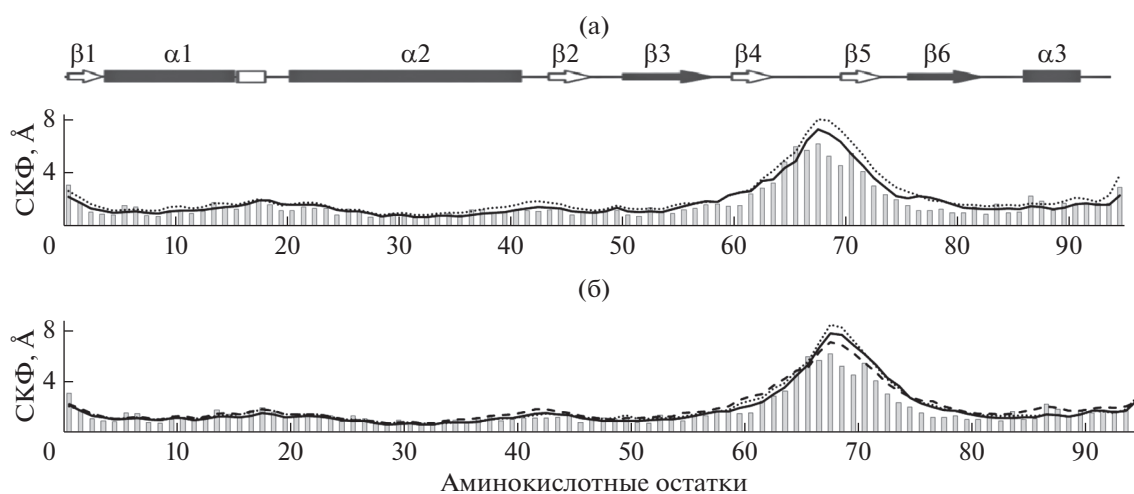


Рис. 2. Среднеквадратичная флуктуация (СКФ) $\text{C}\alpha$ -атомов в течение 50 нс симуляции методом молекулярной динамики, вычисленная для свободного HUSpm дикого типа (серые столбики), и HUSpm с заменами аминокислотных остатков, формирующих два центра стеккинг-взаимодействий на границе между мономерами в димере HUSpm (рис. 1в): а – мутация F29A (сплошная линия), F29A + F14A + V17T (пунктир); б – мутации F49A (штриховая линия), F52A + F81A (сплошная линия), K35T (пунктир). Вторичная структура HUSpm [13] показана сверху.

ностью которой является значительная подвижность β -ленточных рук ДНК-связывающего домена в отсутствие ДНК. Именно такое поведение HU-белков в растворе наблюдается при их исследованиях с помощью ЯМР-спектроскопии [5, 13]. Аланиновые замены остатков фенилаланина, образующих ароматические кластеры стэкинг-взаимодействий в α -спиральном домене и в области перехода α -спиралей в β -складчатую укладку, приводили к дополнительному усилению подвижности ДНК-связывающего домена, включая не только β -ленточные руки (β -слои 4 и 5 и петля между), но и относительно стабильную седловидную основу (β -слои 3 и 6), которая обеспечивают адаптацию ДНК-связывающего домена при переходе белка из свободного состояния в конформацию захвата ДНК, что, как полагают, обеспечивает высокую прочность ДНК-белковых комплексов, имеющих константы диссоциации в наномолярных областях [10]. Такой же эффект наблюдался при замене K35T, приводящей к нарушению межмолекулярного полярного контакта между сигналом димеризации (петля между β -слоями 2 и 3) одного мономера и C-концевой областью α -спирали 2 второго мономера. Данные результаты коррелируют с результатами молекулярно-динамических исследований комплексов HUSpm с ингибиторами, мишенями которых является граница между мономерами в димере: в [10, 12] показано, что нарушение межмолекулярных контактов, вызванное связыванием ингибитора, приводит к увеличению подвижности ДНК-связывающего домена. Таким образом, полученные результаты подтверждают постулат о том, что, воздействуя на границу между мономерами в димере, можно контролировать ДНК-связывающие свойства HU-белков и, как следствие, подавлять их биологические функции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-01001) в части моделирования методом молекулярной динамики и при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках Государственного задания ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН в части структурного анализа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dillon S.C., Dorman C.J. // Nature Rev. Microbiol. 2010. V. 8. P. 185. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2261>
2. Камашев Д.Э., Ракитина Т.В., Матюшкина Д.С., Евсютина Д.В., Ванюшкина А.А., Агапова Ю.К., Анисимова В.Е., Дробышев А.Л., Бутенко И.О., Побегуц О.В., Фисунов Г.Ю. // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 524. <https://doi.org/10.1134/S0132342319050026>
3. Kamashev D.E., Agapova Y.K., Rastorguev S., Talyzina A.A., Boyko K.M., Korzhenevskiy D.A., Vlaskina A., Vasilov R., Timofeev V.I., Rakitina T.V. // PLoS One. 2017. V. 12(11). P. e188037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188037>
4. Boyko K.M., Gorbacheva M.A., Rakitina T.V., Korzhenevskiy D.A., Dorovatovsky P.V., Lipkin A.V., Popov V.O. // Sci. Rep. 2016. V. 3. P. 36366. <https://doi.org/10.1134/S1607672914040012>
5. Altukhov D.A., Talyzina A.A., Agapova Y.K., Vlaskina A.V., Korzhenevskiy D.A., Bocharov E.V., Rakitina T.V., Timofeev V.I., Popov V.O. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2016. V. 36. P. 45. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1264893>
6. Glass J.I., Assad-Garcia N., Alperovich N., Yooseph N., Lewis S., Maruf M.R., Hutchison M., Smith C.A., Venter H.O., Craig J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 425. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510013103>
7. Stojkova P., Spidlova P., Stulik J. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2019. V. 9. P. 159. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00159>
8. Bhowmick T., Ghosh S., Dixit K. // Nature Commun. 2014. V. 5. P. 4124. <https://doi.org/10.1038/ncomms5124>
9. Liu R., Sun Y., Chai Y., Li S., Li S., Wang L., Su J., Yu S., Yan J., Gao F., Zhang G., Qiu H., Gao G., Qi J., Wang H. // PNAS. 2020. V. 117. P. 11000. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922523117>
10. Agapova Y.K., Altukhov D.A., Timofeev V.I., Stroylov V.S., Mityanov V.S., Korzhenevskiy D.A., Vlaskina A.V., Smirnov E.V., Bocharov E.V., Rakitina T.V. // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 15128. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72113-4>
11. Raj R., Agarwal N., Raghavan S., Chakraborti T., Poluri K.M., Kumar D. // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 161. P. 231. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.039>
12. Агапова Ю.К., Алтухов Д.А., Камашев Д.Э., Тимофеев В.И., Смирнова Е.В., Ракитина Т.В. // Кристаллография. 2020. Т. 65 С. 900. <https://doi.org/10.31857/S0023476120060041>
13. Timofeev V.I., Altukhov D.A., Talyzina A.A., Agapova Y.K., Vlaskina A.V., Korzhenevskiy D.A., Klymenov S.Y., Bocharov E.V., Rakitina T.V. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2018. V. 36. P. 4392. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1417162>
14. Агапова Ю.К., Талызина А.А., Алтухов Д.А., Лаврентьев А.Л., Тимофеев В.И., Ракитина Т.В. // Кристаллография. 2019. Т. 64. С. 602. <https://doi.org/10.1134/S1063774519030027>
15. Christodoulou E., Rypniewski W.R., Vorgias C.R. // Extremophiles. 2003. V. 7 P. 111. <https://doi.org/10.1007/s00792-002-0302-7>
16. Boyko K.G., Rakitina T.V., Korzhenevskiy D.A., Korzhenevskiy D., Vanyushkina A., Kamashev D., Lipkin A., Popov V. // Acta Crystallogr. F. 2015. V. 71. P. 24. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14025333>
17. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. // Acta Crystallogr. D. 2010. V. 66. P. 486. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
18. Abraham R.G., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith G.S., Hess B., Lindahl E. // SoftwareX. 2015. V. 1–2. P. 19. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>

Effect of Dimer Interface Disruption on the Structural and Dynamic Properties of HU Protein from *Spiroplasma Melliferum*

A. S. Komolov¹, Yu. K. Agapova^{1,*}, V. I. Timofeev^{1,2}, T. V. Rakitina^{1,3}

¹National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia

²Shubnikov Institute of Crystallography FSRC "Crystallography and Photonics" RAS, Moscow, 119333 Russia

³Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, 117997 Russia

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

The effect of replacements of amino acid residues that form the interface between monomers in the dimer of the HU protein from *Spiroplasma melliferum* (HUSpm) on the stability and conformational dynamics of the molecule was investigated. The behavior of single and multiple HUSpm mutants was studied by molecular dynamics. The simulation was carried out using the GROMACS software package, and OPLS was used as a force field. For each mutant, a full-atom simulation was performed with a duration of 50 ns. The data obtained showed that violations of the interface between monomers in the alpha-helical domain increased the mobility of the molecule in the DNA-binding domain.

Keywords: histone-like proteins, HU proteins, structural analysis, intermolecular contacts, stacking interactions, molecular dynamics, conformational dynamics.