

На правах рукописи

Агапова Юлия Константиновна

HU белок из *Spiroplasma melliferum*: структурная организация, специфичность ДНК-связывания и низкомолекулярные ингибиторы

1.5.3. - Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в лаборатории «Геномная фабрика» Центра геномных исследований «Курчатовский геномный центр» Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Научный руководитель:

Ракитина Татьяна Владимировна кандидат химических наук.

Официальные оппоненты:

Иванов Александр Владимирович, доктор биологических наук; заместитель директора по научной работе, ФГБУН институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук.

Горбачев Алексей Юрьевич, кандидат биологических наук; руководитель лаборатории протеомного анализа, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина.

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита состоится «13» марта 2024 года в 11.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан « » _____ 2024 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор физико-математических наук

В.А. Олейников



Общая характеристика работы.

Актуальность темы работы

Пространственная организация (архитектура) геномной ДНК имеет большое значение для регуляции всех процессов, связанных с хранением и реализацией генетической информации, не только в ядре эукариотической клетки, но и в гораздо более просто устроенном бактериальном нуклеоиде. За поддержание пространственной структуры нуклеоида отвечают нуклеоид-ассоциированные белки (НАБ). Гистоноподобный белок HU (гистоноподобный белок, впервые полученный из U93 штамма *Escherichia coli*) является наиболее консервативным и наиболее представленным НАБ бактериальной клетки.

Белок HU присутствует абсолютно во всех бактериях, но отсутствует в эукариотической клетке и поэтому является потенциальной фармакологической мишенью для разработки антибактериальных препаратов, востребованных в медицине и ветеринарии. В 2014 было показано, что низкомолекулярные ингибиторы, полученные методом молекулярного докинга на основании пространственной структуры HU белка из *Mycobacterium tuberculosis* (MtbHU), способны нарушать структуру нуклеоида и тормозить рост бактерии.

В большинстве бактерий отсутствие HU белка хотя и вызывает нарушение адаптационных способностей и патогенности, но зачастую компенсируется другими НАБ. В то же время, для самых простых представителей бактериального царства (*Mollicutes*) отсутствие HU белка становится летальным, так как он является единственным представителем НАБ в минимальной клетке. Предположительно, HU белок способен функционально замещать компоненты системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR-mismatch repair), отсутствующие у многих представителей класса *Mollicutes*.

Микоплазмы - паразитические бактерии, характерными особенностями которых является отсутствие клеточной стенки, редуцированный геном и ограниченные биосинтетические возможности, вызывают инфекционные заболевания человека и животных, плохо поддающиеся стандартной антибиотикотерапии. Кроме того, микоплазменные инфекции клеточных культур создают серьезные проблемы для биотехнологических производств и научных исследований, использующих клеточные технологии.

Отсутствие пространственных структур HU белков микоплазменного происхождения, являлось препятствием для поиска их низкомолекулярных ингибиторов, обладающих антимикоплазменной активностью.

Целью работы было изучение природного разнообразия HU белков, сравнительный анализ ДНК связывающей способности HU белков микоплазменного и не микоплазменного происхождения, а также структурный анализ и поиск низкомолекулярных ингибиторов

микоплазменного HU белка из *Spiroplasma melliferum*.

Для достижения цели были поставлены и решены следующие **задачи**:

Биоинформатический анализ близкородственных гистоноподобных белков бактерий (HU и IHF). Отбор модельных HU белков для функциональных исследований.

Получение и функциональная характеристика HU белков бактерий *Neisseria gonorrhoeae* (HUNg), *Spiroplasma melliferum* (HUSpm), *Mycoplasma gallisepticum* (HUMGal) и *Escherichia coli* (HUEcoli). Сравнительный анализ ДНК связывающей способности модельных HU белков.

Сравнительный анализ кристаллической структуры HUSpm. Поиск структурных детерминант его высокой термостабильности.

Поиск низкомолекулярных ингибиторов HUSpm методом молекулярного докинга. Изучение влияния бисфенольных производных флуорена (БПФ) на ДНК-связывающие свойства модельных HU белков (HUSpm, HUMGal и HUEcoli) и на рост микоплазмы в культуре.

Уточнение сайта связывания ингибиторов методом сайт-специфического мутагенеза.

Научная новизна

Биоинформатический анализ нескольких тысяч гистоноподобных белков (HU и IHF) выявил неправомерность разделения HU белков на α и β типы, на основании их сходства с α и β субъединицами HUEcoli.

Сравнение ДНК-связывающих свойств новых (полученных и охарактеризованных в данной работе) представителей HU с наиболее изученным (эталонным) белком HUEcoli, показало, что каждый белок HU имеет индивидуальный профиль сродства к различным ДНК-структурам, при этом повышенная специфичность к наиболее сложным структурам характерна для всех модельных белков.

Сравнительный анализ пространственной структуры HUSpm, дополненный исследованиями термостабильности белка дикого типа и мутантных форм показал, что аминокислотные остатки, ответственные за высокую термостабильность HUSpm отличаются от тех, о которых сообщалось в работах по исследованию термостабильности HU белков термофильных бактерий *Bacillus stearothermophilus* (Hubs), *Thermotoga maritima* (HUtm) и *Thermus thermophilus*.

Методом виртуального скрининга были обнаружены новые ингибиторы HU белков, относящиеся к бисфенольным производным флуорена, которые блокировали ДНК-связывающую способность HUSpm, HUMGal и HUEcoli со значениями IC_{50} в диапазоне от 5 до 10 мкм, а также подавляли рост микоплазмы в культуре.

Сайт направленный мутагенез HUSpm в совокупности с результатами,

полученными параллельно с помощью гетероядерной спектроскопии ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения и молекулярно-динамической симуляции, показал, что ингибирующее действие БПФ связано не с конкуренцией с ДНК, а с их способностью препятствовать образованию высоко-аффинного ДНК-белкового комплекса.

Теоритическая и практическая значимость работы

Были расширены знания о семействе белков HU в целом и в частности о HU белках микоплазм.

Пространственная структура HUSpm, полученная с высоким разрешением, была использована для изучения структурных детерминант, определяющих высокую термостабильность белка, а также для поиска низкомолекулярных ингибиторов методом молекулярного докинга.

Были получены и охарактеризованы низкомолекулярные ингибиторы ДНК-связывающей способности HU белков, способные ингибировать рост микоплазмы в культуре, которые могут стать прототипами новых антибактериальных препаратов.

Было установлено, что в связывании БПФ и коротких модельных ДНК ключевую роль играют разные области HUSpm, что указывало на аллостерический механизм ингибирования, который ранее обсуждался в научной литературе, но не имел экспериментального подтверждения.

Основные положения, выносимые на защиту:

- На основании аминокислотной последовательности каждый представитель гистоноподобных белков HU/INF (InterPro ID IPR000119) может быть однозначно отнесен к одной из трех групп: HU, INF_A или INF_B.
- Сравнение ДНК-связывающих свойств четырех представителей HU белков, показало, что каждый HU белок имеет свой индивидуальный профиль аффинности к различным ДНК-структурам, увеличение аффинности коррелирует с увеличением сложности и размера ДНК-структуры.
- Граница между мономерами в димере HUSpm обладает следующими особенностями по сравнению с другими структурно-изученными HU-белками: (1) увеличенное количество водородных связей и энергии гидрофобных контактов при полном отсутствие солевых мостиков между мономерами в димере; (2) участие остатков неконсервативной α -спирали и неконсервативных остатков Phe в формировании дополнительного ароматического кластера в гидрофобном ядре димерного интерфейса.
- К детерминантам, ответственным за высокую термостабильность HUSpm, относятся неконсервативные остатки Phe14 и Phe29, полуконсервативный Phe31 и остаток Lys35, формирующий

водородную связь с Gly48 из последовательности сигнала димеризации соседнего мономера.

- Бисфенольные производные флуорена (БПФ) способны ингибировать ДНК-связывающую активность HU белков с IC₅₀ в диапазоне 5-10 мкМ, а также подавлять рост микоплазмы в культуре.
- Замены положительно-заряженных остатков в центральной части ДНК-связывающего домена заметно влияют на ДНК-связывающую способность HUSpm, но не на связывание ингибитора с HU белком.

Личный вклад

Агапова Ю.К. принимала активное участие в планировании и постановке экспериментов, разработке методик, а также в обработке и анализе результатов.

Автором был проведён биоинформатический анализ, а также клонирование генов и получение (выделение и очистка) четырех рекомбинантных HU белков. Сравнение ДНК-связывающих свойств полученных HU было проведено с использованием метода изменения электрофоретической подвижности ДНК в геле.

Был проведён анализ пространственной структуры HUSpm и выявлены аминокислотные остатки, ответственные за высокую термостабильность HU белка. Были получены и охарактеризованы с использованием метода дифференциальной сканирующей калориметрии мутантные формы HUSpm.

Автором была проведена проверка способности бисфенольных производных флуорена ингибировать ДНК-связывающие свойства HU белков из *S. melliferum*, *M. gallisepticum* и *E. coli* и подавлять рост микоплазмы в культуре. Были получены мутантные формы HUSpm и проверена их способность связывать модельные ДНК и БПФ, позволившие уточнить механизм действия ингибиторов.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов определяется надёжностью применявшихся методов исследования, повторяемостью значений измеряемых параметров в многочисленных экспериментах. Полученные в работе результаты подтверждаются современными исследованиями в данной тематике.

Полнота опубликования в печати и апробация результатов

Содержание работы отражено в 28 публикациях, в том числе в 9 статьях, опубликованных в рецензируемых научных журналах (WoS, Scopus, РИНЦ), и в 18 тезисах конференций. Был получен 1 патент.

Объем и структура работы

Работа написана на 109 страницах машинописного текста и включает 27 рисунков и 16 таблиц; содержит введение, обзор литературы, описание

материалов и методов исследования, обсуждение результатов, выводы, список использованной литературы. Библиографический указатель содержит 164 источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение:

Во введении отражена актуальность темы, научная новизна и практическая значимость, сформулированы цель и задачи работы, приведены положения, выносимые на публичное представление, степень достоверности и апробация результатов.

Глава 1. Обзор литературы

В главе 1 представлен литературный обзор, посвящённый общей характеристике нуклеоид-ассоциированных белков бактерий и описанию структурно-функциональных особенностей HU белков. В завершении обзора обсуждаются различные механизмы образования ДНК-белковых комплексов между HU из различных организмов и разными ДНК-дуплексами, предложенные на основании структурных исследований.

Глава 2. Материалы и методы

В главе 2 представлено развернутое описание экспериментальной работы, включая клонирование, получение (выделение и очистка) рекомбинантных HU белков, изучение их ДНК-связывающей способности в присутствии и отсутствии низкомолекулярных ингибиторов методом изменения подвижности ДНК в геле, а также проведение сайт-специфического мутагенеза и исследование полученных мутантных белков. Теоретическая часть работы включала расчет констант диссоциации и концентраций полуингибирования, анализ пространственной структуры белка с целью поиска структурных детерминант термостабильности и анализ результатов молекулярного докинга.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей гистоноподобных белков бактерий.

Было проведено множественное выравнивание HU/HNF белков и их дальнейшая кластеризация. Было установлено, что по аминокислотной последовательности гистоноподобные белки можно разделить на три главных группы: HU, HNF_A или HNF_B (рис. 1). Иными словами, по первичной структуре каждый представитель семейства белков HU/HNF (InterPro ID IPR000119) может быть однозначно отнесен к одной из трех групп: HU, HNF_A или HNF_B.

При проведении биоинформатического анализа было замечено, что аннотации в базах данных не всегда аккуратны: 2% последовательностей HU белков ошибочно были идентифицированы как HNF, а 1% в HNF_A или HNF_B

ошибочно были идентифицированы как HU белки. При этом где-то треть белков HU/IHF просто аннотируется как «ДНК-связывающий белок»; без дальнейшего отнесения белков к HU, IHF_A или IHF_B.

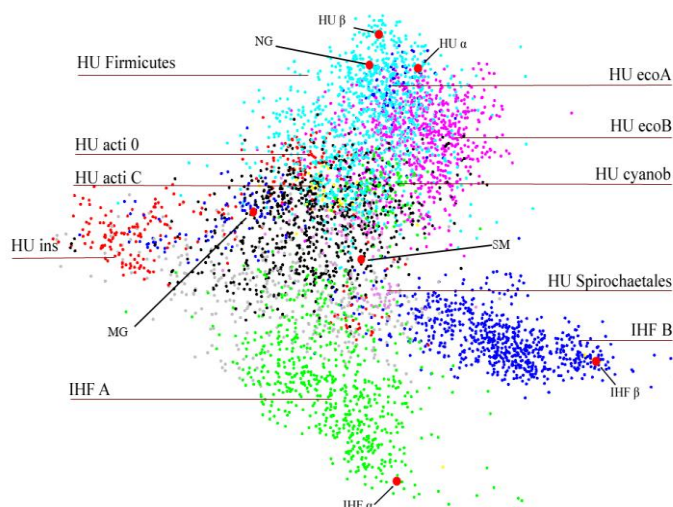


Рисунок 1. Результаты множественного выравнивания и кластеризации аминокислотных последовательностей белков HU и IHF. Указаны три основные группы белков, HU, IHF_A и IHF_B, а также результаты дальнейшей кластеризации HU белков.

В качестве объектов исследования были выбраны как похожие и таксономически близкие HU белки HUEcoli и HUNg из *E. coli* и *N. gonorrhoeae*, так и удалённые от них HU белки микоплазм HUSpm из *S. melliferum* и HUMgal из *M. gallisepticum*. Хорошо изученный HU-α белок *E. coli* был взят в качестве контроля.

3.2 Получение рекомбинантных HU белков HUEcoli, HUNg, HUMgal, HUSpm и изучение их ДНК-связывающих способностей.

3.2.1 Получение белковых препаратов.

Гены отобранных белков были получены с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на матрице геномной ДНК, выделенной из соответствующих бактерий, и клонированы в плазмидные вектора системы pET для индуцибельной экспрессии в клетках *E. coli*. Помимо целевого белка плазмидные конструкции содержали нуклеиновые последовательности, кодирующие N-концевые шести-гистидиновы (6xHis) таги и сайты TEV-протеазы. Плазмидные конструкции были трансформированы в экспрессирующий штамм *E. coli* BL21(DE3)RIPL. После наработки биомассы, индукции экспрессии и осаждения клеток, выделение и очистку рекомбинантных белков клеток проводили с помощью двухстадийной аффинной хроматографии. Между двумя стадиями хроматографии белковый препарат подвергался гидролизу TEV протеазой (Рисунок 2А). Финальную очистку проводили методом гель-фильтрационной хроматографии (Рисунок

2Б). Выходы рекомбинантных белков составляли 5-10 мг с литра бактериальной культуры.

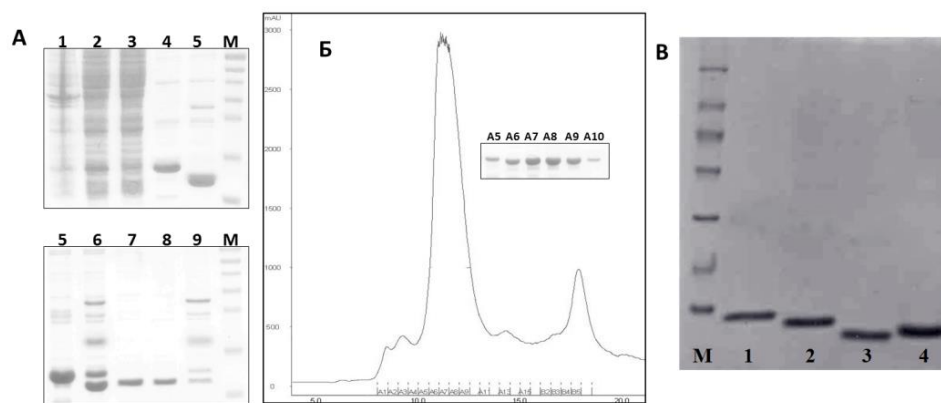


Рисунок 2. Результаты хроматографической очистки рекомбинантного HU белка из микоплазмы *S. meliferum*: А. Электрофореграммы белковых фракций, полученных при проведении первой (верхняя панель) и второй (нижняя панель) стадии металлохелатной хроматографии: 1- тотальный белок, 2- осветлённый лизат, 3- осадок, 4- промывка колонки, 5- элюция адсорбированного белка, 6- протеолиз белка, 7- пропуск первая фракция, 8- пропуск вторая фракция, 9- элюция после протеолиза, М-маркер молекулярных масс (PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder). Б. Хроматограмма результатов гель-фильтрационной хроматографии на колонке Superdex G-75 (GE Healthcare). На врезке электрофоретический анализ собранных белковых фракций. В. Финальные препараты: 1- HUMgal, 2- HUSpm, 3- HUNg, 4- HUEcoli.

3.2.2 Сравнительный анализ особенностей ДНК-связывания исследуемых гистонopodobных белков.

Для исследования ДНК-связывающих способностей выделенных HU белков использовали различные ДНК-дуплексы, полученные из синтетических олигонуклеотидов разной длины, один из которых содержал флуоресцентную метку на 5'-конце. Формирование комплексов контролировали по торможению ДНК в геле при проведении электрофореза в нативных условиях (EMSA).

Связывание белков HU с канонической правильной дцДНК считается слабым (неспецифическим), такие комплексы легко распадаются при высокой ионной силе. Поэтому электрофоретический анализ ДНК-белковых комплексов проводили при низкой концентрации соли (40 мМ NaCl в 50 мМ трис-боратном буфере). Для эксперимента использовали набор ДНК-дуплексов длиной от 21 до 36 п.о. Целью эксперимента было определение, какое увеличение длины ДНК-дуплекса приводит к связыванию дополнительного HU белка. В результате было обнаружено, что для HUEcoli и HUNg, с ДНК длиной 21 п.о. связывается 2 димера, а третий димер связывается, когда ДНК увеличивается до 29 п.о., т.е. посадка одного димера требует длины ДНК 9-10 п.о. В то же время, при таком же молярном соотношении белок-ДНК, в случае микоплазменных HU белков наблюдается

абсолютно другая картина. Для HUS ρ m связывание даже второго белка практически отсутствовало на всём диапазоне длин ДНК от 21 до 36 п.о. Для HUMgal очень слабое связывание второго димера наблюдалось в диапазоне длин ДНК 31-36 п.о. Такой результат, скорее всего, указывает на то, что в условиях эксперимента, микоплазменные HU белки связывают ДНК по классическому механизму.

Для изучения более прочного специфического связывания HU белков с различными ДНК-структурами, эксперименты проводили при «физиологической» концентрации соли, 150 мМ NaCl. В эксперименте были задействованы различные ДНК-структуры. В эксперименте были задействованы различные ДНК-структуры, приведённые на рисунке 3.

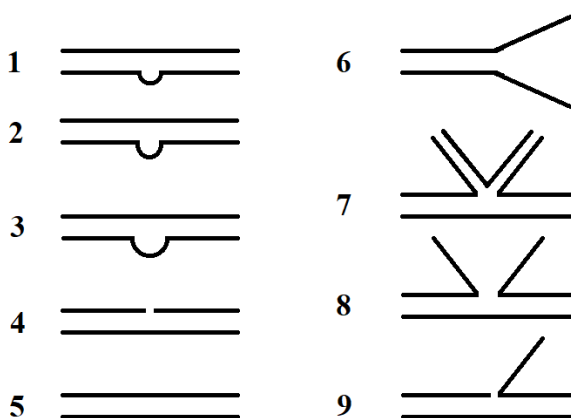


Рисунок 3. Схематическое изображение олигонуклеотидных дуплексов и триплексов, имитирующих различные репликационные и репарационные ДНК-структуры: 1. Линейная дцДНК с одно-нуклеотидной вставкой в одной из цепей (A1); 2. Линейная дцДНК с три-нуклеотидной вставкой в одной из цепей (A3); 3. Линейная дцДНК с семи-нуклеотидной вставкой в одной из цепей (A7); 4. дцДНК с разрывом (Nick, N) 5. дцДНК (дц); 6. Y-образная ДНК (вилка, Fork); 7. X-образная ДНК (структура Холлидея, J); 8. T-образная ДНК (iJ); 9. Проникающая ДНК (inv).

После проведения EMSA, гели сканировали и на основании количественной оценки свободной и связанной ДНК определяли константы диссоциации комплексов и профили аффинности HU белков к разным ДНК-структурам (рис. 4).

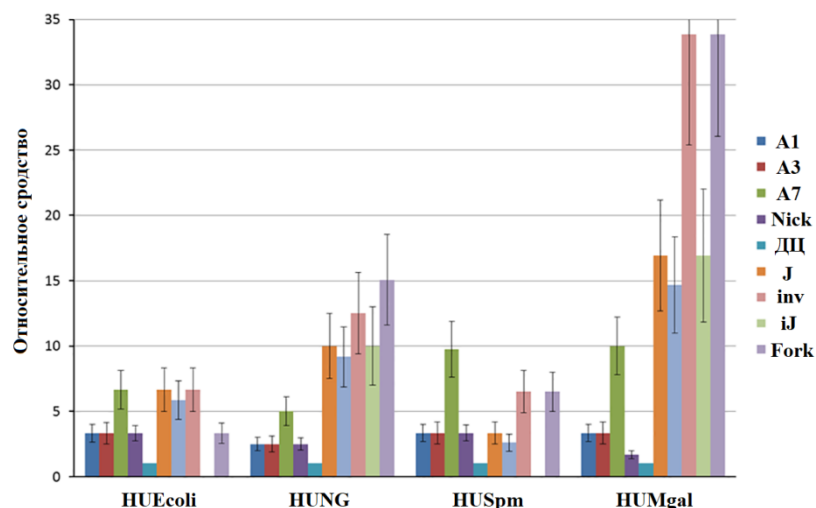


Рисунок 4. Профили аффинности HU белков к различным ДНК-структурам. В каждом столбце представлена константа ассоциации комплекса HU с одной структурой ДНК (описание структур в условных обозначениях к рис. 4), нормированная на константу ассоциации комплекса того же белка с диДНК.

Таким образом, сравнение ДНК-связывающих свойств четырех представителей HU белков, близко или отдаленно родственных друг другу, показывает, что каждый HU белок имеет свой индивидуальный профиль аффинности к различным ДНК-структурам с повышенной специфичностью к более сложным структурам.

3.3. Пространственная структура HUSpm, полученная методом рентгеноструктурного анализа.

Для структурных исследований был выбран микоплазменный белок HUSpm, так как он содержал явные нарушения классической (консенсусной) последовательности HU белков, характерной для HUEcoli и HUNG. Кристаллизационные эксперименты проводили на базе лаборатории Белковая фабрика НИЦ “Курчатовский институт”, дифракционные данные с полученных кристаллов собирали на станции Белок синхротронного источника «КИСИ-Курчатов». В результате была получена пространственная структура с разрешением 1.36 Å. Структура была депонирована в Protein Data Bank (PDB ID 5L8Z).

HUSpm — это гомодимер, каждый мономер которого состоит из 100 аминокислотных остатков, включая 6 остатков N-концевого гистидинового тага. В мономере можно выделить 2 домена димеризационный домен и ДНК-связывающий домен, ответственный за связывание молекулы ДНК.

Несмотря на то, что структура мономера HUSpm характеризуется канонической укладкой полипептидной цепи, свойственной белкам этого класса, в его структуре есть ряд отличий. Обычно димеризационный домен состоит всего из двух α -спиралей ($\alpha 1$ и $\alpha 2$), соединенных гибкой петлей из нескольких аминокислотных остатков (рис. 5). В случае HUSpm в этом домене за счет вставки из двух аминокислотных остатков появляется

дополнительная спираль – $\alpha 1'$. Наличие этой спирали способствует выпячиванию петли, на которой она расположена, и формированию дополнительного гидрофобного контакта между мономерами. В формировании этого контакта участвуют неконсервативные остатки Phe14 и Val17, а также остаток Leu18 каждого из мономеров.

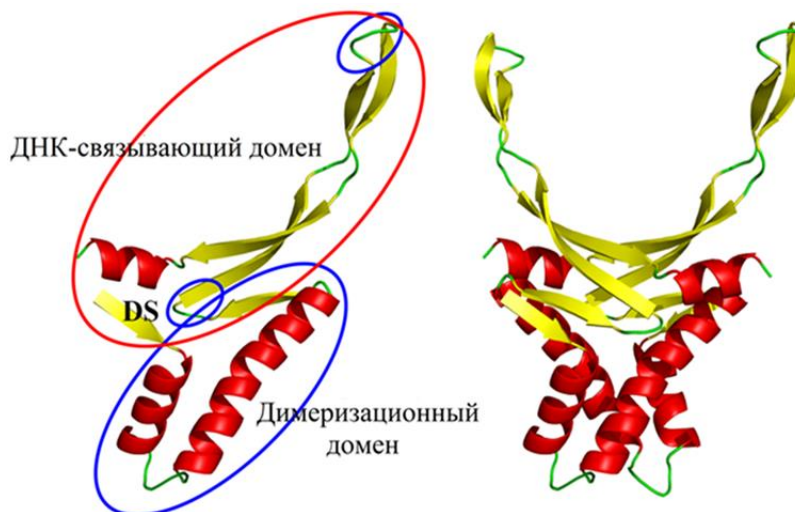


Рисунок 5 Мономер и димер HUSpm. Цветовая схема показывает элементы вторичной структуры: красным – α -спирали, синим – β -слои.

3.3.1 Особенности границы между мономерами в димере HUSpm.

Так как функциональной единицей любого HU белка является димер мы проанализировали интерфейс между мономерами в димере HUSpm и сравнили его с интерфейсами других HU белков, обладающих разной термостабильностью (табл. 1). Анализ площади димерного интерфейса показывает, что в случае HUSpm абсолютное значение данного показателя самое высокое, однако в процентном соотношении эти значения для всех белков примерно одинаковы. Количество аминокислотных остатков в интерфейсе (в том числе гидрофобных) для всех белков также сравнимы друг с другом. В то же время, прочность гидрофобных взаимодействий, оцениваемая по выигрышу в энергии сольватации при формировании димера, у HUSpm выше, чем у остальных HU белков. Из этого следует, что различие в прочности гидрофобных взаимодействий димеров HU белков определяется не количеством гидрофобных остатков, а их размером и взаимным расположением. Кроме того, в димерном контакте отсутствуют солевые мостики, и присутствует увеличенное количество водородных связей (табл. 1).

Таблица 1. Сравнение димерных контактов в HUSpm и в HU белках из мезофильных и термофильных бактерий, для которых известна пространственная структура.

		Площадь димерного контакта Å ² (%)	Водородные связи (3.5Å)	Солевые мостики (4.0Å)	Число остатков в димерном контакте (гидрофобные)	ΔiG, kcal/mol (учитываются гидрофобные контакты)
1	<i>S. melliferum</i>	2267.0 (30.2)	14	0	52 (35)	-44,3
2	<i>E. coli</i> ¹	1773.3 (32.7)	5	6	46 (38)	-35,2
3	<i>T. maritima</i>	1868.9 (33.4)	7	5	47 (32)	-40.1
4	<i>B. stearothermophilus</i>	1778.4 (27.8)	6	4	44 (33)	-41.4

¹Для HU белка из *E. coli* показаны данные для гетеродимера. Количество водородных связей, солевых мостиков и гидрофобных остатков в димерном интерфейсе посчитано вручную. Красным показаны названия термофильных организмов-источников HU белков, синим – мезофильных.

Анализ аминокислотной последовательности показал, что HUSpm имеет 6 остатков фенилаланина, в то время как остальные HU белки - от трех до четырех. При этом все остатки фенилаланина у HU белков принимают участие в формировании гидрофобного кора димерного интерфейса. В случае HUSpm два неконсервативных остатка фенилаланина Phe14, о котором было написано ранее, и Phe29 также расположены в гидрофобном коре димерного интерфейса. Более того остаток Phe14 из одного мономера расположен рядом с остатком Phe29 другого мономера, образуя ароматический кластер, что способствуют упрочнению гидрофобного контакта (рис. 6).

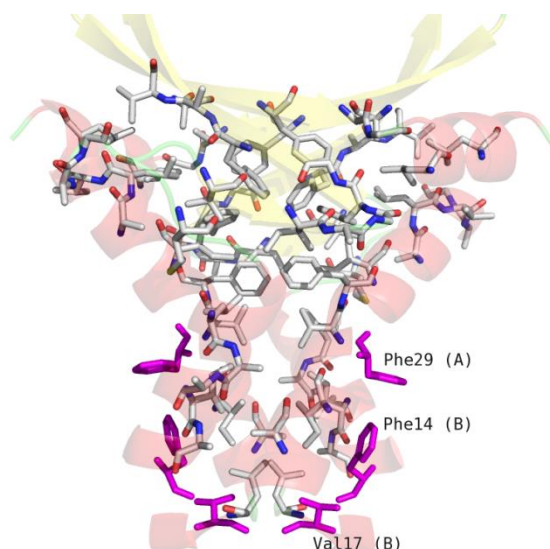


Рисунок 6. *Ароматический кластер в димерном интерфейсе HUSpm. Серыми палочками показаны остатки, формирующие гидрофобный кор у димера HUSpm. Неконсервативные остатки Phe14, Phe29 и Val17 из обоих мономеров показаны розовым.*

Интересной особенностью димеров ряда HU белков является внутренняя полость размером порядка 100\AA^3 , расположенная в гидрофобном ядре границы между мономерами. В HUSpm эта полость отсутствует, что может способствовать упрочнения гидрофобного контакта.

Таким образом, граница между мономерами в димере HUSpm обладает следующими особенностями: неконсервативный ароматический кластер, включающий неконсервативные остатки фенилаланина и остаток валина из дополнительной α -спирали, полуконсервативный остаток фенилаланина, заполняющий внутреннюю полость в димерном интерфейсе, а также дополнительные водородные связи между мономерами, отсутствующие у гомологичных HU белков.

3.3.2 Структурные детерминанты термостабильности HUSpm.

HU белки являются классическим объектом изучения структурных детерминант термостабильности. Ранее было показано, что именно солевые мостики между двумя мономерами в димере отвечают за повышенную термостабильность HU белков экстремофильных бактерий; в то же время во всех работах по изучению термальной денатурации HU белков отмечалось, что гидрофобные взаимодействия играют важную роль в стабилизации димеров. Поэтому было решено проверить, какое влияние оказывает необычная граница между мономерами в димере HUSpm на термостабильность белка.

Термальная денатурация HUSpm была исследована с помощью ДСК. Анализ кривой плавления показал наличие двух тепловых переходов, имеющих максимумы ($T_{\text{плавл}}$) при 74.5 и 87.3°C , что свидетельствовало о высокой термостабильности.

Основываясь на анализе границы раздела между мономерами в димере HUSpm, описанном выше, было предположено, что структурными детерминантами, отвечающим за высокую термостабильность HUSpm, могли быть дополнительные гидрофобные контакты, связанные с неконсервативными остатками фенилаланина в интерфейсе, а также дополнительные водородные связи между мономерами, отсутствующие у гомологичных HU белков.

Чтобы оценить влияние вышеуказанных остатков на термостабильность HUSpm, был получен и протестирован ряд точечных мутантов (табл. 2). Все мутанты образовывали стабильные димеры, что было подтверждено методом гель-фильтрации.

Таблица 2. Влияние мутаций на температуру плавления HUSpm.

Мутация	HUSpm	F14A	F29A	V17T	F31L	L35T	N92K	F14A - F29A
T _{плав} , °C	74.5, 87.3	63.0	45.2, 59.2	74.2	64.2	49.7, 77.1	70.7	47.0

Тепловую денатурацию HUSpm и всех мутантов изучали с помощью ДСК при концентрации белка 2,0 мг/мл в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 0,2 М NaCl. Сравнительный анализ тепловой денатурации всех шести мутантов и HUSpm (контроль) показан в таблице 2.

Как следует из таблицы 2, мутации приводили к таким изменениям, как сдвиги пиков денатурации на кривых плавления и, в некоторых случаях, к исчезновению одного из них. Это исчезновение можно объяснить тем, что два близко расположенных пика накладываются друг на друга.

Таким образом, структурный анализ белка в сочетании с мутагенезом и ДСК выявил ключевые структурные детерминанты, ответственные за высокую термостабильность HUSpm, к которым можно отнести неконсервативные остатки Phe14 и Phe29, которые способствуют усилению гидрофобного ядра димерного интерфейса, полуконсервативный Phe31, который отвечает за отсутствие внутренней полости на границе между мономерами в димере, и остаток Lys35, который участвует в образовании уникальной водородной связи между мономерами.

3.4 Бисфенольные производные флуорена ингибируют ДНК-связывающую способность HU белков и рост микоплазмы в культуре.

3.4.1 Поиск низкомолекулярных ингибиторов HU белков.

Был проведен виртуальный скрининг химической библиотеки Vitas-M laboratories (<http://www.vitasmlab.com/>) с целью поиска низкомолекулярных ингибиторов HU белков. В качестве мишени для проведения скрининга использовали полученную кристаллическую структуру HUSpm. В качестве потенциального сайта связывания сначала была выбрана центральная часть ДНК-связывающего домена. На последующих этапах проводили

дополнительные молекулярные докинги и молекулярно-динамические исследования (МД) потенциальных комплексов, а также докинг отобранных соединений по всей поверхности белка. Процедуры скрининга библиотеки и молекулярного докинга проводили в коллаборации с ООО "Молтех" используя разработанные в компании программные продукты. Отобранные по результатам первого этапа скрининга, потенциальные ингибиторы были получены от компании Vitas-M laboratories и проверены на способность ингибировать ДНК-связывающие свойства HUSpm. Эксперимент проводили методом EMSA с использованием соединений в концентрации 100 мкМ и олигонуклеотидных дуплексов длиной 24 или 48 п.о. (рис.7).

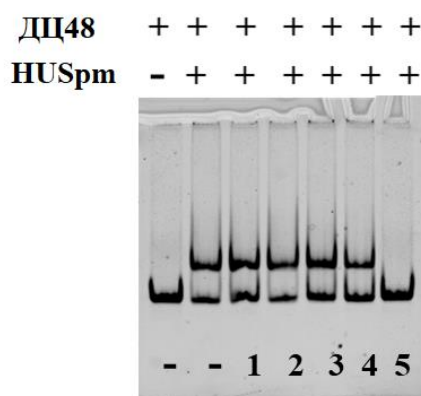
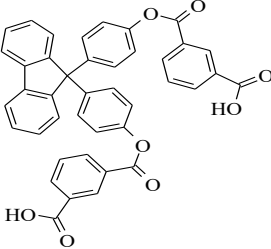


Рисунок 7. Влияние соединений 1-5 на образование комплекса HUSpm-ДНК. В присутствии соединения 5 комплекс не образуется.

Наилучшие результаты были получены с соединением, относящимся к классу бисфенольных производных флуорена (БПФ2 в табл. 3), поэтому было решено дополнительно получить и исследовать 2 аналога исходно-найденного соединения (БПФ1 и 3 в табл. 3).

Таблица 3. Описание исследуемых бисфенольных производных флуорена.

Название	Молекулярная структура	Молекулярная формула (молекулярная масса)
БПФ1		$C_{43}H_{26}O_{12}$ (734)
БПФ2		$C_{57}H_{40}N_2O_{10}$ (912)

БПФ3		$C_{41}H_{26}O_8$ (646)
------	---	----------------------------

3.4.2 Влияние БФП на ДНК-связывающие свойства HU белков и рост микоплазмы в культуре.

Соединения, представленные в таблице 4, были проверены на способность ингибировать ДНК-связывающие свойства трёх HU белков: HUSpm, HUMgal, HUEcoli.

Все соединения проявили ингибирующую активность в отношении всех белков-мишеней с концентрацией полумаксимального ингибирования (IC_{50}) в микромолярных диапазонах (<10 мкМ) (табл. 4). Во всех случаях наблюдаемый порядок соединений по эффективности ингибирования был постоянным: БПФ1 > БПФ2 > БПФ3. Разница между БПФ1 и БПФ2 не была значительной, в то время как БПФ3 показал несколько более высокие значения IC_{50} .

Таблица 4. Ингибирование комплекса HU белок-ДНК бисфенольными производными флуорена.

Соединения	БПФ1	БПФ2	БПФ3
HU белок	IC_{50} , мкМ (среднее значение \pm стандартное отклонение, n = 3)		
HUSpm	5.6 \pm 0.8	6.3 \pm 0.7	8.2 \pm 1.1
HUMgal	5.0 \pm 0.6	5.9 \pm 0.8	8.1 \pm 1.0
HUEcoli	7.5 \pm 1.0	7.5 \pm 0.9	10 \pm 1.3

Поскольку известно, что HU белки необходимы для жизнеспособности клеток микоплазмы, было решено оценить влияние ингибиторов на рост *M. gallisepticum* и *S. melliferum* в культуре. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) БФП1, БФП2 и БФП3 для соответствующих микоплазм определяли в тесте микроразведений в бульоне. Было обнаружено, что МИК находятся в диапазоне от 40 до 70 мкМ. БФП3 имел наихудшую МИК по сравнению с БФП1 или БФП2, чьи МИК существенно не отличались друг от друга.

Таким образом, было установлено, что БФП ингибируют ДНК-связывающую способность HU белков с IC_{50} в диапазоне 5-10 мкМ, а также рост микоплазмы в культуре.

3.4.3 Уточнение сайта связывания БПФ методом сайт-специфического мутагенеза.

Чтобы подтвердить найденный докинг сайт связывания БПФ в центральной части ДНК-связывающего домена, были получены мутантные производные HUSpm, содержащие аланиновые замены положительно-заряженных остатков, R57A, K80A, R88A. По данным моделирования эти остатки принимали участие, как в связывании ДНК, так и в связывании ингибитора. Был выполнен сайт-направленный мутагенез, получены рекомбинантные белки и проверены их способности связывать ДНК и ингибитор.

Анализ ДНК-связывающих свойств полученных мутантов методом торможения ДНК в геле показал, что данные замены существенно повышают константы диссоциации ДНК-белковых комплексов (рис.7).

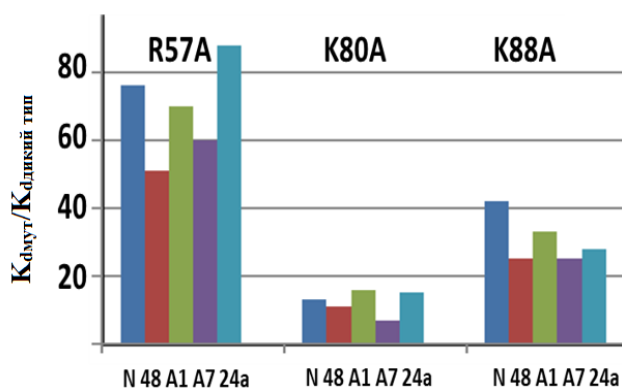


Рисунок 8. Константы диссоциации ДНК-белковых комплексов, образованных мутантными белками, нормализованные к константам диссоциации, аналогичных комплексов, образованных HUSpm дикого типа.

Влияние мутаций на связывание БПФ1 с HUSpm проверяли методом изотермической титрационной калориметрии (ИТК) (табл. 5), которая показала, что константы диссоциации комплекса HUSpm отличаются не значительно.

Таблица 5. Константы диссоциации комплексов БПФ1 с HUSpm и его мутантными производными, полученные методом изотермической титрационной калориметрии (ИТК).

K _d (мкМ) комплексов БПФ1 с HUSpm и его мутантными производными были получены для одно-сайтового связывания.				
HUSpm	HUSpm_R57A	HUSpm_K80A	HUSpm_R88A	HUSpm_K35T
7.6±1.1	7.5±1.1	5.7±0.7	10±2.2	2.1±0.3

Параллельно с проведением мутагенеза, комплекс HUSpm с ДНК в присутствии и отсутствии БПФ1 изучали методом гетероядерной ЯМР спектроскопии высокого разрешения. Результаты ЯМР спектроскопии, указывали на то, что ингибитор взаимодействует с ДНК за пределами

центральной части ДНК-связывающего домена. Поэтому было решено проверить влияние БПФ1 на полученный ранее мутант HUSpmK35T, с заменой поверхностного остатка K35 участвующего в формировании контактов между мономерами в димере. Проведённые эксперименты (EMSA и ИТС) показали, что данная мутация приводит к снижению как константы диссоциации комплекса (табл. 5), так и к снижению IC₅₀ БПФ1 в отношении данного мутанта с 5.6 мкМ до 1.9 мкМ. Остаток K35 участвовал в образовании водородной связи с сигналом димеризации противоположного мономера, нарушение которой приводило к снижению термостабильности димера HUSpm (табл. 2). Результаты ИТС в совокупности с данными ЯМР спектроскопии указывали на то, что ингибирующее действие БПФ связано не с конкуренцией с ДНК, а с их способностью препятствовать образованию высокоаффинного ДНК-белкового комплекса.

Выводы.

- Показано, что каждый представитель семейства белков HU/INH (InterPro ID IPR000119) может быть однозначно отнесен к одной из трех групп: HU, INH_A или INH_B.
- Впервые получены и функционально охарактеризованы новые HU белки из организмов *Neisseria gonorrhoeae*, *Spiroplasma melliferum*, *Mycoplasma gallisepticum*. Показано, что каждый из исследуемых HU белков имеет свой индивидуальный профиль аффинности к различным ДНК-структурам.
- Получена и охарактеризована пространственная структура HU белка из микоплазмы *Spiroplasma melliferum*. Выявлены ключевые структурные детерминанты, ответственные за высокую термостабильность белка.
- Впервые найдено, что бисфенольные производные флуорена (БПФ) ингибируют ДНК-связывающую способность HU белков с IC₅₀ в диапазоне 5-10 мкМ. Показано, что БПФ проявляют антимикробную активность в отношении микоплазм.
- Показано, что в ключевую роль в связывании БПФ и короткой дцДНК играют разные аминокислотные остатки, что позволяет предположить, что ингибирующее действие БПФ не связано с конкуренцией с ДНК за сайт связывания, а имеет аллостерическую природу.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи в журналах

1. **Agapova Yu. K.**, Altukhov D., Timofeev V., Stroylov V., Mityanov V., Korzhenevskiy D., Vlaskina A., Smirnova E., Bocharov E., Rakitina T. (2020). Structure-based inhibitors targeting the alpha-helical domain of the *Spiroplasma melliferum* histone-like HU protein. Scientific Reports. 15, 15128.
2. Kamashev D.N., **Agapova Y.K.**, Rastorguev S.A., Talyzina A.A., Boyko K.M., Korzhenevskiy D.A., Vlaskina A., Vasilov R., Timofeev V.I., Rakitina T.V. (2017).

- Comparison of histone-like HU protein DNA-binding properties and HU/INF protein sequence alignment. PLoS One., 12, e0188037.
3. Boyko K.M., Rakitina T.V., Korzhenevskiy D.A., Vlaskina A.V., **Агапова Ю.К.**, Kamashev D.E., Kleymenov S.Y., Popov V.O. (2016). Structural basis of the high thermal stability of the histone-like HU protein from the *mollicute Spiroplasma melliferum* KC3. Sci. Rep., 6, 36366.
 4. **Агапова Ю.К.**, Талызина А.А., Алтухов Д.А., Лаврентьев А.Л., Тимофеев В.И., Ракидина Т.В. (2019) Виртуальный скрининг, мишенью которого были сигналы димеризации двух микоплазменных HU-белков, выявил разные типы ингибиторов, взаимодействующих с общими детерминантами связывания, Кристаллография, 64, 577-582.
 5. **Агапова Ю.К.**, Алтухов Д. А., Камашев Д. Э., Тимофеев В. И., Смирнова Е. В., Ракидина Т. В., (2020). Ингибитор, нацеленный на границу между мономерами белка HU из *Spiroplasma melliferum*, нарушает конформационную динамику и ДНК-связывающие свойства белка. Кристаллография. 2020, 65, 900-906.
 6. **Агапова Ю.К.**, Петренко Д.Е., Тимофеев В.И., Ракидина Т.В. (2022). Сравнительный анализ границы между мономерами в димере бактериальных гистоноподобных белков HU методом ММ, Кристаллография, 67, 918–925.
 7. Талызина А.А., **Агапова Ю.К.**, Подшивалов Д.Д., Тимофеев В.И., Сидоров-Бирюков Д.Д., Ракидина Т.В., (2017). Применение виртуального скрининга и молекулярной динамики для анализа селективности ингибиторов HU белков, направленных на ДНК-распознающий сайт. Кристаллография, 62, 917–922.
 8. Юдкина О.В., Корженевский Д.А., Власкина А.В., Зейфман Ю.С., Фатеева Т.В., Митянов В.С., Стройлов В.С., **Агапова Ю.К.**, Ракидина Т.В. (2018) Бисфенольные производные флуорена, обладающие антиминоплазменной активностью, и способ их получения. Патент РФ RU 2657731C1.
 9. Камашев Д.Э., Ракидина 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. (2019). Изменение протеомного профиля *e. coli* при удалении генов, кодирующих гистоноподобный белок HU: по данным дифференциального двумерного гель-электрофореза, Биоорганическая химия. 45, 524–533.
 10. Комолов А.С., **Агапова Ю.К.**, Тимофеев В.И., Ракидина Т.В. (2021). Влияние нарушения границы между мономерами в димере на структурно-динамические свойства HU-белка из *Spiroplasma melliferum*. Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, 10, 15623–27.

Тезисы докладов

1. Франк-Каменецкая А.М., **Агапова Ю.К.**, Ракидина Т.В., «Влияние низкомолекулярных ингибиторов HU белков на их ДНК связывающую способность», сборник трудов национальной молодежной научной школы для молодых ученых, аспирантов и студентов старших курсов по современным методам исследований наносистем и материалов "Синхротронные и нейтронные исследования" (СИН-нано-2015), Москва, 6-10 августа 2015 года, стр. 128.
2. **Агапова Ю.К.**, Ракидина Т.В., Франк-Каменецкая А.М., «Изучение структурных основ термостабильности HU белка из микоплазмы *Spiroplasma melliferum*», сборник трудов 13-ой Курчатовской молодежной научной школы, секция «Биомедицинские технологии и ядерная медицина», Москва, 27-30 октября 2015 г, с. 44-45.

3. Франк-Каменецкая А.М., Агапова Ю.К., Ракитина Т.В., «Изучение ДНК связывающей способности HU белков из *Spiroplasma melliferum* и их низкомолекулярных ингибиторов», сборник трудов 13-ой Курчатовской молодежной научной школы, секция «Биомедицинские технологии и ядерная медицина», Москва, 27-30 октября 2015 г, с. 93.
4. Агапова Ю.К., Ракитина Т.В., Франк-Каменецкая А.М. «Необычная термостабильность HU белка из микоплазмы *Spiroplasma melliferum*», сборник трудов 58-ой научной конференции МФТИ, секция «НБИК-технологии», Москва, 23-28 ноября 2015 г.
5. Ю.К. Агапова, Д.А. Алтухов, А.В. Власкина, Д.А. Корженевский, А.Ю. Николаева, К.М. Бойко, Э.В. Бочаров, Т. В. Ракитина «Структурные основы термостабильности бактериальных HU белков», сборник тезисов участников форума Наука будущего наука молодых, секция «Науки о жизни и медицина», Казань, 20—23 сентября 2016 г., с. 20-22.
6. Талызина А.А., Алтухов Д.А., Агапова Ю.К., Власкина А.А., Корженевский Д.А., Ракитина Т.В., Тимофеев В.И., «Повышенная конформационная гибкость HU белка из *Micoplasma gallisepticum*», сборник трудов 14-ой Курчатовской молодежной научной школы, секция «Биомедицинские технологии и ядерная медицина», Москва, 8-11 ноября 2016 г, с. 102.
7. Агапова Ю.К., Алтухов Д.А., Власкина А.В., Корженевский Д.А., Николаева А.Ю., Бойко К.М., Бочаров Э.В., Ракитина Т.В., «Структурные основы термостабильности бактериальных HU белков», сборник тезисов Первого кристаллографического конгресса, секция «Кристаллография в биологии и медицине», Москва, 21-26 ноября 2016 г, с. 227.
8. Агапова Ю.К., Д.А. Алтухов, Камашев, Ракитина Т.В., «Сравнительный анализ ДНК-специфичности гистонподобных белков из протеобактерий и микоплазм», сборник трудов 15-ой Курчатовской молодежной научной школы, секция «Биомедицинские технологии и ядерная медицина», Москва, 14-17 ноября 2017 г, с. 65.
9. Агапова Ю.К., Алтухов Д.А., Тимофеев В.И., Корженевский Д.А., Власкина А.В. Бочаров В.Э., Ракитина Т.В., «Влияние конформационной подвижности на термальную стабильность и ДНК-связывающие свойства двух микоплазменных HU белков», сборник тезисов Международной научная конференции "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды" Москва, 18-22 сентября 2017 г., стр.111-112.
10. Korzhenevskiy D.D., Altukhov V., Timofeev V.I., Agapova Y.K. Vlaskina A., Bocharov E., Rakitina T. (2017). Structural basis underlying different stability and DNA-binding properties of two mycoplasmal HU-proteins. The FEBS Journal 284, Suppl. 1, 195 - WoS, Q1
11. Agapova Y, Fateeva T, Timofeev V, Rakitina T. (2018). Mycoplasma HU proteins restore growth deficit of *E. coli* with double genetic knockout of hupA and hupB genes. FEBS OPEN BIO, 8, 167 - Scopus, WoS, Q2
12. Агапова Ю.К., Комолов А.С., Тимофеев В.И., Ракитина Т.В., «Влияние нарушения димерного интерфейса на структурно-динамические свойства HU белка из *Spiroplasma melliferum*», сборник тезисов тринадцатого ежегодного заседания Научного Совета по физике конденсированных сред при отделении физических наук РАН и научно-практического семинара «Актуальные проблемы физики конденсированных сред», 23–26 ноября 2020 г. Черногловка, стр.102

13. **Агапова Ю.К.**, Тимофеев В.И., Ракитина Т.В.. Исследование прочности интерфейса между мономерами гистоноподобных HU белков метода MM-GBSA с целью создания методологии выявления термостабильных димеров. 64-й Всероссийской научной конференции МФТИ, 21 ноября - 03 декабря 2021 года, Москва-Долгопрудный-Жуковский
14. **Агапова Ю.К.**, Алтухов Д.А., Тимофеев В.И., Ракитина Т.В.. Интерфейс между мономерами в димере гистоноподобного белка HU как мишень для низкомолекулярных ингибиторов. Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» 8-11 февраля 2021 г, Москва.
15. **Агапова Ю.К.**, Тимофеев В.И., Ракитина Т.В. Исследование термостабильности гистоноподобных HU белков методом MM-GBSA. XXXV Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 8-11 февраля 2022, Москва.
16. **Агапова Ю.К.**, Гапонов Ю.А., Алтухов Д., Тимофеев В.И., Штыкова Е.В., Бочаров Е.В, Ракитина Т.В. Структурные исследования гистоноподобного белка из *Spiroplasma melliferum* комплементарными методами структурной биологии. XXIX Российская конференция по электронной микроскопии. 29-31 августа 2022 года.
17. Volynsky P., Gaponov Y., Altukhov D., Timofeev V., **Agapova Y.**, Bocharov E., Shtykova E., Rakitina T. Small-angle X-ray scattering study of histone-like protein from *Spiroplasma melliferum* in solution. Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology (BGRS/SB-2022), Новосибирск, 04-08 июля 2022 г.
18. **Агапова Ю.К.**, Петренко Д.Е., Тимофеев В.И., Ракитина Т.В., Анализ димерного интерфейса методом MM-GBSA как способ предсказания термоустойчивости гистоноподобных белков HU. 65-й Всероссийской научной конференции МФТИ, 20-23 сентября 2023 года, Москва-Долгопрудный-Жуковский.