

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА И ФИЗИКА БИОМОЛЕКУЛ MOLECULAR BIOPHYSICS AND PHYSICS OF BIOMOLECULES

МЕХАНИЗМ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО РАСПОЗНАВАНИЯ ЛАНТИБИОТИКОМ НИЗИН ЕГО МИШЕНИ В БИОМЕМБРАНЕ: ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Панина И.С.¹, Нольде Д.Е.¹, Крылов Н.А.¹⁻³, Ефремов Р.Г.^{1,2}

¹ ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997, РФ

² Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»
ул. Мясницкая, 20, г. Москва, 101000, РФ,

³ Межведомственный суперкомпьютерный центр РАН
Ленинский проспект, 32а, г. Москва, 119334, РФ
e-mail: irinaspanina@gmail.com

Аннотация: Низин – это природный пептид группы лантибиотиков, обладающий антибактериальным действием против широкого спектра грамположительных бактерий. Низин селективно связывает трансмембранный переносчик мономерных звеньев пептидогликана – липид-II. Консервативный химический состав сайта связывания – пирофосфатной группы липида-II – делает низин перспективным прототипом новых высокоаффинных и селективных противомикробных препаратов, разработка которых невозможна без понимания точного механизма межмолекулярного распознавания и взаимодействия. С целью изучения структурно-динамических характеристик низина в воде и липида-II в гидратированном липидном бислое была проведена серия расчетов молекулярной динамики соответствующих систем. Показано, что достаточно гибкая в водном растворе N-концевая часть молекулы низина принимает единственную стабильную конформацию в присутствии пирофосфата. Обнаружено, что для пирофосфатной группы липида-II характерно уникальное расположение акцепторов водородной связи в бислое. Среди всех наблюдаемых конформаций липида-II в мембране только одна теоретически подходит для захвата низином. Таким образом, мы предполагаем, что комплекс низин/липид-II в бактериальной мембране образуется путем индуцированного соответствия обеих молекул.

Ключевые слова: лантибиотики, низин, липид-II, биомембраны, молекулярная динамика.

MECHANISM OF INTERMOLECULAR RECOGNITION BY LANTIBIOTIC NISIN IT'S TARGET IN BIOMEMBRANE: A MOLECULAR DYNAMICS STUDY

Panina I.S.¹, Nolde D.E.¹, Krylov N.A.¹⁻³, Efremov R.G.^{1,2}

¹ M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences
Miklukho-Maklaya Str., 16/10, Moscow, 117997, Russia

² National Research University Higher School of Economics
Myasnitskaya Str., 20, Moscow, 101000, Russia

³ Joint Supercomputer Center, Russian Academy of Sciences
Leninskiy Prospect, 32a, Moscow, 119334, Russia
e-mail: irinaspanina@gmail.com

Abstract. Nisin is a natural peptide of lantibiotics group, which has antibacterial action against a wide range of Gram-positive bacteria. Nisin selectively binds to transmembrane carrier of peptidoglycan monomer units – lipid II. The conservative chemical structure of the binding site – pyrophosphate moiety of lipid II – makes nisin a promising prototype of new high-affine and selective antimicrobial agents, development of which is impossible without understanding of the exact mechanism of intermolecular recognition and interaction. In order to explore the structural-dynamic characteristics of nisin in water and lipid II in hydrated lipid bilayer, a series of molecular dynamics (MD) simulations of corresponding systems was carried out. It was shown that, being highly flexible in aqueous solution, the N-terminal part of nisin molecule adopts the major stable conformation in the presence of pyrophosphate. The latter one was found to manifest the unique arrangement of hydrogen bond acceptors in membrane-bound lipid II molecule. Among numerous lipid II conformations observed in the membrane, the only one is theoretically suitable for capturing by nisin. Thus, we suggest that the nisin/lipid II complex in bacterial membrane is formed via an induced fit mechanism involving the both partners.

Key words: lantibiotic, nisin, lipid II, biomembrane, molecular dynamics.

Одной из серьезных проблем современной медицины является быстрое развитие устойчивости бактерий к антибиотикам. В результате повсеместного, а зачастую и неправильного применения, ранее эффективные антибактериальные препараты становятся бесполезными, а инфекционные заболевания имеют более длительное течение и нередко приводят к летальному исходу. В условиях постоянного появления новых штаммов бактерий, устойчивых к большинству антибиотиков, поиск новых классов антибактериальных агентов, наряду с пониманием механизма действия уже известных, являются актуальными научными задачами.

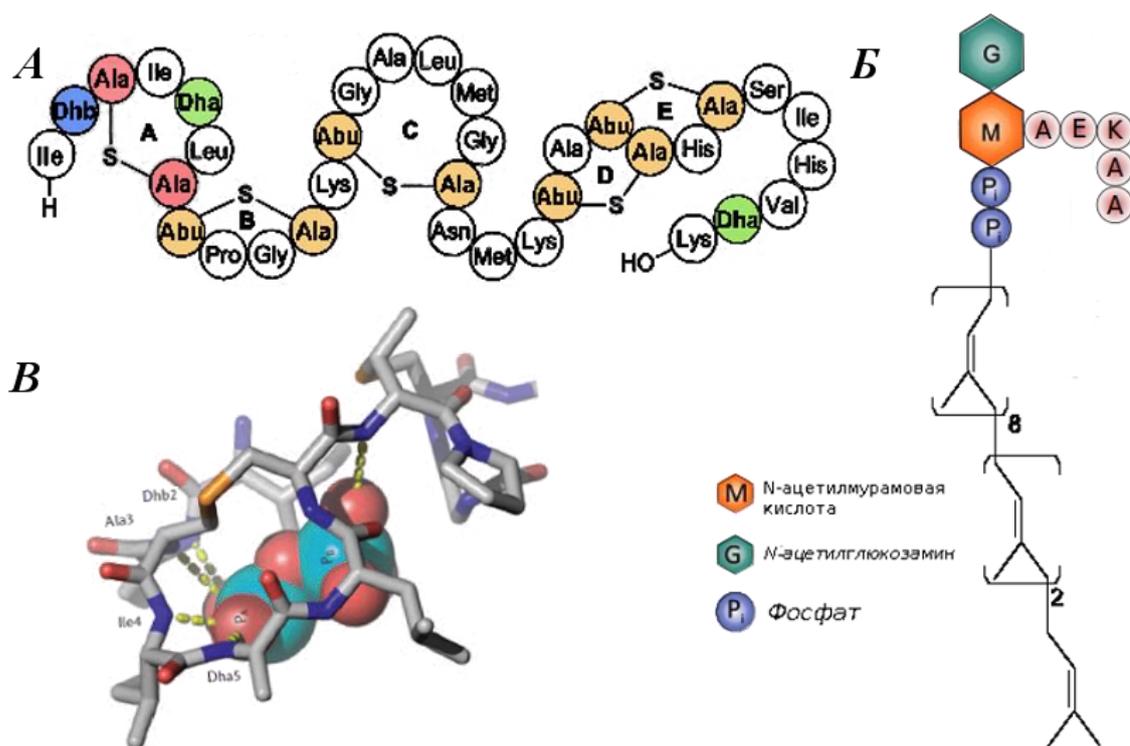


Рисунок 1 – Структура низина, цветом выделены нестандартные аминокислотные остатки: лантионин (Ala-S-Ala), метиллантионин (Abu-S-Ala), дегидроаланин (Dha) и дегидроаминобутерин (Dhb) (А); липида-II (Б); комплекса низина с липидом-II в диметилсульфоксиде (ДМСО) (В) [3]

Среди возможных способов преодоления данной проблемы – создание антибиотиков нового поколения, лишенных недостатка развития бактериями резистентности к ним, потенциальными прототипами которых могут стать лантибиотики. Лантибиотики – это класс антимикробных пептидов (АМП), содержащих в своем составе такие неканонические тиоэфирные аминокислоты как лантионин или метил-лантионин. Наиболее изученным представителем данного класса является низин – посттрансляционно модифицированный пептид, состоящий из 34 аминокислот, содержащий 1 лантиониновое кольцо (А), 4 метил-лантиониновых кольца (В-Е) и 3 дегидропроизводных аминокислотных остатков (см. рис. 1А). Низин активен в отношении широкого спектра грамположительных бактерий. Несмотря на то, что низин известен человечеству с тех пор, как А. Флеминг открыл пенициллин [1], и уже более полувека используется в качестве консерванта для пищевых продуктов (Е234) [2], молекулярный механизм его противомикробного действия остается неизвестным.

Низин убивает бактерии путем разрушения цитоплазматической мембраны, а также путем ингибирования синтеза клеточной стенки [3]. Известно, что низин взаимодействует с молекулой-предшественником бактериальной клеточной стенки – липидом-II, связывание с которой облегчает последующее порообразование [4]. Липид-II состоит из гидрофильной головки, которая представляет собой субъединицу пептидогликана, состоящую из N-ацетилглюкозамина (G) и N-ацетилмурамовой кислоты (M), в положении 3 которой присоединен через линкер пентапептид, а также длинного бактериопренольного «хвоста», соединенного с головкой через пирофосфат (см. рис. 1Б). N-конец низина, содержащий кольца А и В, взаимодействует с пирофосфатом липида-II [5], тогда как С-конец молекулы проникает в бактериальную мембрану [6]. Связывание с липидом-II сопровождается сборкой порового комплекса низин-липид-II в стехиометрическом соотношении 8:4 [7], что приводит к деполяризации мембраны и клеточной гибели. Ввиду консервативной природы пирофосфатной группы, применение в клинической практике веществ с подобным низину механизмом действия поможет предотвратить или отсрочить развитие резистентности у бактерий.

Методом ЯМР спектроскопии установлена пространственная структура комплекса низина с укороченным аналогом липида-II в соотношении 1:1 в ДМСО – неполярном растворителе, слабо имитирующем мембранное окружение [5]. Тем не менее, эта структура позволила выявить основной мотив связывания – NH-группы основной цепи колец А и В низина связывают пирофосфат липида-II при помощи пяти межмолекулярных водородных связей (см. рис. 1В).

Исследование комплекса низин/липид-II, как и любой другой мембранной системы, экспериментальными методами затруднено, в связи с чем актуальными оказываются методы компьютерного моделирования. На данный момент опубликованы результаты нескольких работ, в которых изучение системы низин/липид-II проводили с помощью молекулярной динамики (МД). Наше предыдущее исследование липида-II в бислое показало, что высокоамплитудная динамика гидрофобного хвоста липида-II вызывает долговременные возмущения моделирующей мембраны. Образующая на поверхности бислоя вокруг головки липида-II амфифильная неоднородность, напоминающая по своей форме “гидрофобный атолл”, может играть важную

роль в процессе распознавания лантибиотиками их мишени [8]. Недавние результаты исследования липида-II в анионных мембранах методом спектроскопии комбинационного рассеяния [9] находятся в хорошем соответствии с полученными в нашем вычислительном эксперименте. Впервые комплекс лантибиотика низин с липидом-II в бислое был изучен в работе [10], где было показано, что связывание низина влияет на поведение липида-II в мембране, в основном уменьшая его конформационную свободу. Мулхолланд и его группа, приблизившись к реальной стехиометрии, провели исследование тройного комплекса низин:липид-II = 2:1, которое выявило второй сайт связывания в С-концевой области пентапептида липида-II [11]. В работе [12] показали в вычислительном эксперименте, подтвержденном рядом экспериментальных исследований, липид-II-независимое действие низина как «обычного» АМП. Несмотря на актуальность темы и достаточно большое число работ по ней, ряд вопросов остается неосвещенным: например, что определяет уникальность пирофосфата, позволяющую внеклеточным лантибиотикам высокоселективно распознавать его в мембранном окружении? Какова структура комплекса в реальных условиях, т. е. на поверхности липидного бислоя?

В данной работе с помощью расчетов МД изучены структурно-динамические особенности изолированных молекул лантибиотика и его мишени в их естественных средах. Цель - выяснение механизма межмолекулярного распознавания и взаимодействия. Для расчёта траекторий МД использовали программный пакет Gromacs версии 5.0.4 с использованием параметров тяжелоатомного силового поля (Gromos G43a2). Для оценки экспонированности атомов на поверхности бислоя, а также построения их функции радиального распределения использовали разработанную в лаборатории программу SOMBRERO, реализованную на языке Python с отдельными модулями, написанными на C++. Был проведен расчет трех независимых траекторий МД продолжительностью 1 мкс для липида-II, встроенного в липидный бислой. Последний представлял собой смесь пальмитоилолеилфосфатидилглицерина (ПОФГ) с пальмитоилолеилфосфатидилэтаноломином (ПОФЭ) в соотношении 3:1, что соответствует составу мембран грамположительных бактерий [13]. Также был проведен расчет МД укороченного (аминокислотные остатки 1-11) аналога низина в воде, в присутствии и отсутствии диметилпирофосфата: по пять траекторий длиной 500 нс.

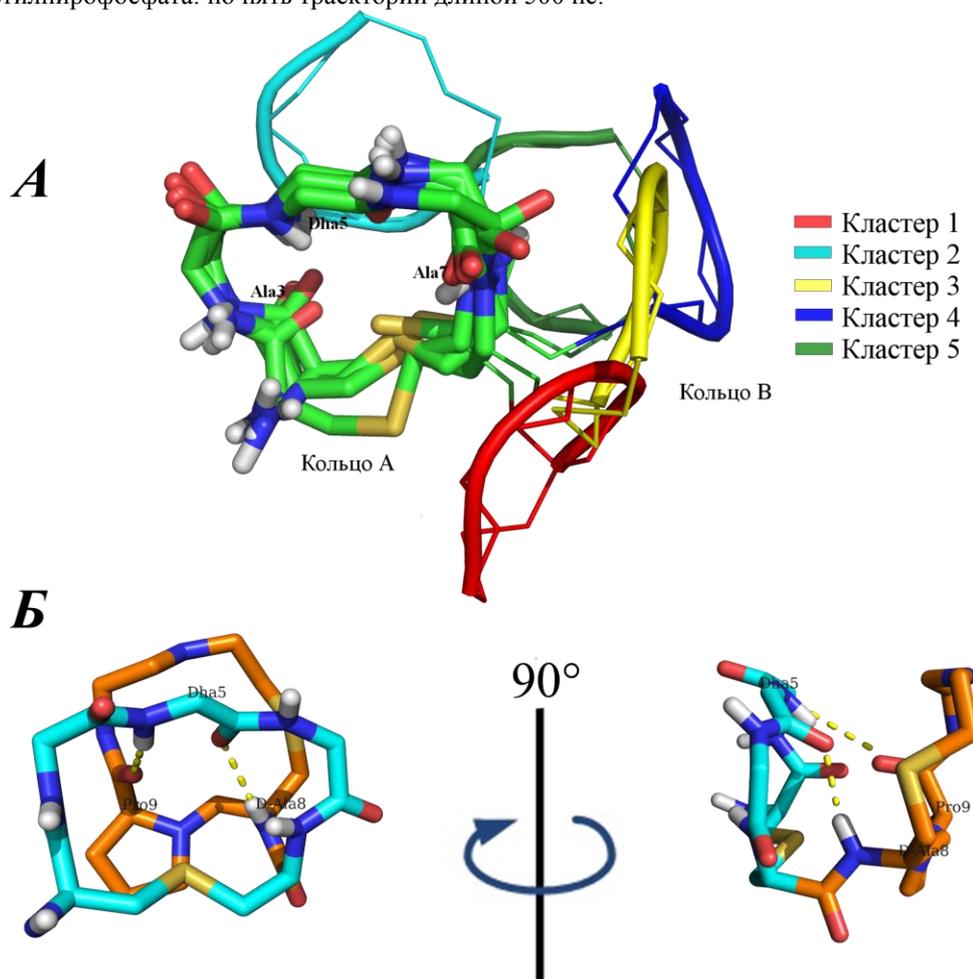


Рисунок 2 – А. Конформации колец А и В низина в водном растворе, совмещенные по NH-группам кольца А. Кластеры пронумерованы в порядке убывания их заселенности; Б. Репрезентативная структура из кластера 2. Пунктирными линиями обозначены водородные связи

Экспериментальными методами было установлено, что низин связывает липид-II с помощью амидных групп так называемой «ловушки», т.е. первых двух колец А и В [5], поэтому основной интерес для нас представляло изучение конформационных возможностей этой части молекулы. Чтобы получить представление

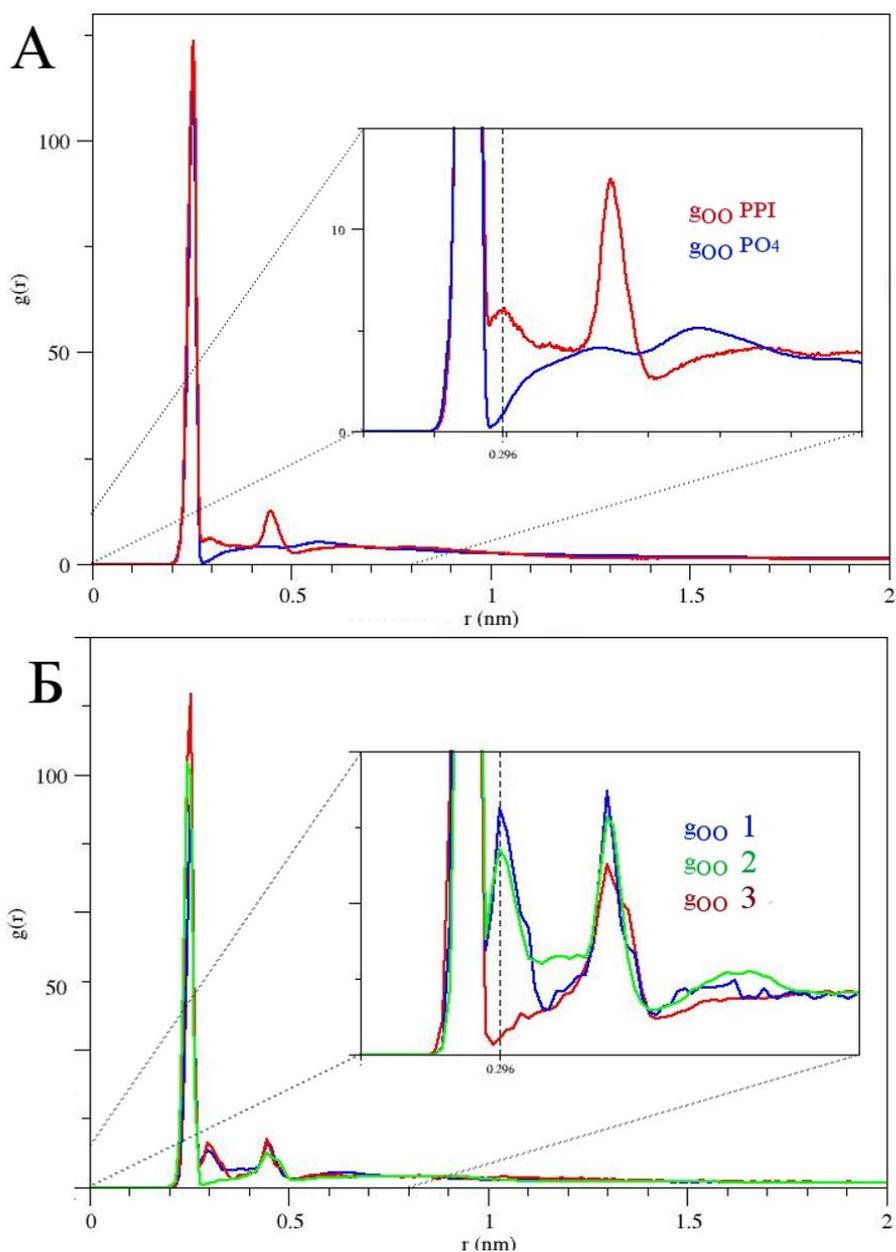


Рисунок 3 – А. Функции радиального распределения кислород-кислород для пирофосфата и фосфатных групп в мембране; Б. Функции радиального распределения кислород-кислород для экспонированных на поверхности бислоя атомов кислорода пирофосфата в конформации 1, 2 и 3

о структуре изолированной ловушки в воде, был проведен кластерный анализ по положениям основной цепи остатков 3-11, который выявил пять предпочтительных конформаций (см. рис. 2А). Интересно, что кольцо А имеет довольно жесткую структуру благодаря наличию внутри колец долгоживущих водородных связей между остатками Ala3 и Dha5 (67% длины траектории) и Dha5 и Ala7 (42%). Эта основная конформация отличается от наблюдаемой в экспериментальном комплексе, а расположение NH-векторов не подходит для захвата пирофосфата. Однако близкое расположение колец, соответствующее структурам, заселяющим кластер 2, индуцирует перегруппировку сети водородных связей, что приводит к изменению векторного направления доноров водородных связей. Водородная связь между Dha5 и Pro9 способствует изменению геометрии кольца А (см. рис. 2Б). В этом состоянии кольцо А имеет четыре сонаправленные NH-группы над плоскостью кольца, полученные в результате изменения значений двугранных углов ψ_6 и φ_7 . Кольцо В, несмотря на меньший размер и наличие в его составе остатка пролина, проявляет гораздо более высокую конформационную подвижность.

Чтобы изучить конформационные изменения ловушки, индуцируемые присутствием мишени, провели сравнительный анализ ее поведения в растворе с диметилпирофосфатом. Комплекс образуется незамедлительно при добавлении в систему диметилпирофосфата. Сайт связывания пирофосфата локализуется в пределах первых 7 остатков, то есть кольца А и N-концевых остатков Ile1 и Dhb2. Быстрый обмен молекул пирофосфата в комплексе наблюдался до тех пор, пока ловушка не принимала конформацию, соответствующую кластеру 2 (см. рис. 2Б). Конформация стабилизировалась при связывании субстрата: ее время жизни достигало 450 нс, тогда как в водном растворе не превышало 100 нс. Кроме того, число межмолекулярных водородных связей составляло от 4 до 6, в сравнении с 3-4, наблюдаемыми при других конформациях ловушки. Найденная структура комплекса отличается от полученной в ЯМР-исследовании [5], однако отличия могут определяться природой растворителя.

Анализ рассчитанных траекторий липида-II в мембране показал, что головка молекулы принимает широкий спектр конформаций, сохраняя локализацию большинства ее остатков выше поверхности бислоя. Пирофосфат расположен на той же высоте относительно нормали к плоскости бислоя, как и фосфатные группы других липидов. Наиболее гибкой частью молекулы является длинный изопреноидный хвост, о чем свидетельствует анализ среднеквадратичных флуктуаций (0,7 нм по сравнению с 0,2-0,5 нм для остальных частей).

Пирофосфатная группа в бислое имеет 3 различных конформации, определяющих взаимное расположение головки и хвоста молекулы. Эти состояния могут быть количественно охарактеризованы величиной двугранного угла O-P-P-O, между двумя атомами фосфора и связанными с ними замещенными атомами кислорода. В ходе МД угол OPPO принимает значения, равные $65 \pm 17^\circ$ (состояние 1), $-61 \pm 12^\circ$ (2) и $176 \pm 10^\circ$ (3).

Поскольку пирофосфат играет решающую роль в межмолекулярном взаимодействии [5], он должен обладать неким уникальным свойством, позволяющим внеклеточным лантибиотикам распознавать их мишень в химически сходной среде. Мы проанализировали функции радиального распределения (ФРП) кислород-кислород (gOO (r)) атомов кислорода пирофосфатной группы, а также фосфатных групп липидов в бислое (см. рис. 4А). ФРП пирофосфата не зависит от его конформации. Первый максимум совпадает для обеих функций и соответствует внутримолекулярным O-O расстояниям в фосфате. Наибольшее отличие двух функций находится в области 0,3 нм, где наблюдается локальный максимум пирофосфата, тогда как такое O-O расстояние нехарактерно для фосфатов липидов. Подробный анализ показал, что на расстоянии 3,0 Å находятся атомы кислорода пирофосфата, связанные с соседними атомами фосфора.

В том случае, если такое уникальное распределение акцепторов водородной связи играет важную роль для пирофосфата как мишени, атомы кислорода должны быть доступны на поверхности мембраны. С помощью разработанной в лаборатории программы SOMBRERO были построены gOO (r) только экспонированных на поверхности атомов кислорода пирофосфата. Было установлено, что атомы кислорода на интересующем расстоянии «видны» на поверхности только тогда, когда пирофосфат принимает конформации 1 и 2, тогда как в состоянии 3 они оказываются развернутыми в толщу бислоя (см. рис. 4Б). Таким образом, только две из трех конформаций пирофосфата экспонируют на поверхности бислоя атомы кислорода на уникальном расстоянии, что позволяет считать их «активными», т. е. теоретически подходящими для захвата ловушкой.

В результате совмещения найденной структуры ловушки с конформацией 1 липида-II в мембране были получены потенциально возможные, стерически не затрудненные, модели комплекса, тогда как альтернативная конформация 2 пирофосфата не позволяет сформировать комплекс. Таким образом, конформационные пространства обеих индивидуальных молекул в их естественных средах содержат хотя бы одну заведомо готовую к взаимодействию конформацию. Следующим этапом станет сборка и изучение структурно-динамических свойств моделей комплекса на поверхности липидного бислоя.

Работа выполнена в рамках Проекта «5-100» государственной поддержки ведущих университетов Российской Федерации, программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского Фонда фундаментальных исследований (грант 16-04-00578). Авторы благодарны СКЦ «Политехнический» СПбПУ и МСЦ РАН за предоставленные суперкомпьютерные ресурсы.

Список литературы / References:

1. Rogers L.A. The inhibiting effect of streptococcus lactis on lactobacillus bulgaricus. *J. Bacteriol.*, 1928, vol. 16, pp. 321-325.
2. Delves-Broughton J. [et al.] Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1996, vol. 69, pp. 193-202.
3. McAuliffe O., Ross R.P., Hill C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2001, vol. 25, pp. 285-308.
4. Breukink E. [et al.] Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, 1999, vol. 286, pp. 2361-2364.
5. Hsu S.-T.D. [et al.] The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2004, vol. 11, pp. 963-967.
6. Breukink E. [et al.] The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. *Biochemistry*, 1997, vol. 36, pp. 6968-6976.
7. Hasper H.E., de Kruijff B., Breukink E. Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochemistry*, 2004, vol. 43, pp. 11567-11575.
8. Chugunov A. [et al.] Lipid-II forms potential «landing terrain» for lantibiotics in simulated bacterial membrane. *Sci. Rep.*, 2013, vol. 3, 1678.
9. Sosa Morales M.C., Álvarez R.M.S. Structural characterization of phosphatidylglycerol model membranes containing the antibiotic target lipid II molecule: a Raman microspectroscopy study. *J. Raman Spectrosc.*, 2017, vol. 48, pp. 170-179.
10. Koch D.C. [et al.] Structural dynamics of the cell wall precursor lipid II in the presence and absence of the lantibiotic nisin. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr.*, 2014, vol. 1838, pp. 3061-3068.
11. Mulholland S., Turpin E.R., Bonev B.B., Hirst J.D. Docking and molecular dynamics simulations of the ternary complex nisin2:lipid II. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, p. 21185.
12. Prince A. [et al.] Lipid-II independent antimicrobial mechanism of nisin depends on its crowding and degree of oligomerization. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, p. 37908.
13. Prossnigg F., Hickel A., Pabst G., Lohner K. Packing behaviour of two predominant anionic phospholipids of bacterial cytoplasmic membranes. *Biophys. Chem.*, 2010, vol. 150, pp. 129-35.