

СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ КОМПЛЕКСА ЛАНТИБИОТИКА НИЗИН С ЛИПИДОМ-II В БИОМЕМБРАНЕПанина И.С.¹, Нольде Д.Е.¹, Чугунов А.О.¹, 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, РФ² Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики
ул. Мясницкая, 20, г. Москва, 101000, РФ
e-mail: irinaspanina@gmail.com

Аннотация: Низин является первым открытым лантибиотиком и на сегодняшний день механизм его антибактериального действия был исследован с использованием различных методов. В то время как установлена структура комплекса низина с липидом-II в растворе, о реальной структуре комплекса в липидном бислое ничего не известно. С целью предсказания структуры комплекса в мембранном окружении мы провели серию расчетов молекулярной динамики изолированных молекул в их естественной среде, а также комплекса в растворе. Показано, что липид-II в мембране может принимать конформации, теоретически подходящие для захвата «ловушкой». Несвязанная в комплекс молекула низина, напротив, не соответствует найденным в комплексе структурам, тем не менее, ее высокая подвижность дает возможность предположить, что захват мишени приводит к индуцированным структурным изменениям. Кроме того, в присутствии липида-II на поверхности мембраны образуются стабильные изменения рельефа и гидрофобных свойств. Сделан вывод о том, что липид-II вместе с окружающими его липидами мембраны образует специфическую платформу, распознаваемую лантибиотиками как сайт связывания.

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

STRUCTURAL DYNAMICS MODEL OF LANTIBIOTICS NISIN/LIPID-II COMPLEX IN BIOMEMBRANEPanina I.S.¹, Nolde D.E.¹, Chugunov A.O.¹, Efremov R.G.^{1,2}¹ M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry of the Russian Academy of Sciences
Miklukho-Maklaya St., 16/10, Moscow, 117997, Russia² National Research University Higher School of Economics
Myasnitckaya St., 20, Moscow, 101000, Russia
e-mail: irinaspanina@gmail.com

Abstract: Nisin is the first discovered lantibiotics and to date its antibacterial mechanism has been investigated using a variety of methods. While the structure of nisin/lipid-II complex in solution is established, the native structure of the complex in lipid bilayer is unknown. In order to predict the complex structure in membrane, we conducted a series of molecular dynamics simulations of isolated molecules in their natural environment and their complex in solution. Our experiments revealed that the membrane-bound lipid-II could adopt conformations theoretically suitable for capturing by the "trap" (nisin). By contrast, free nisin molecule does not correspond to those found in complex structures, however, its high flexibility suggests that target capture leads to induced structural changes. Furthermore, it was shown, that lipid-II forms stable changes of membrane surface topography and its hydrophobic properties. Thus, we suggest that lipid-II with its membrane surrounding forms a specific platform that is recognized by lantibiotics as the binding site.

Key words: lantibiotics, nisin, lipid-II, molecular dynamics.

На сегодняшний день, когда патогенные микроорганизмы развивают резистентность к антибиотикам быстрее, чем ученые успевают разрабатывать новые, возрастает интерес к антимикробным веществам, выделяемым самими бактериями для борьбы с представителями других штаммов — бактериоцинам. Помимо поиска новых антибиотиков, очень большое значение имеет понимание механизма действия уже известных антимикробных соединений, которое позволило бы направленно изменять их свойства.

Одним из наиболее изученных бактериоцинов является низин — посттрансляционно модифицированный антимикробный пептид, принадлежащий классу лантибиотиков вследствие наличия в его структуре (метил)лантиониновых колец, а также дегидропроизводных аминокислотных остатков (см. рис. 1А). Известно, что низин взаимодействует с трансмембранным переносчиком мономерных звеньев пептидогликана — липидом-II [1, 2]. Молекула липида-II состоит из головки — дисахарида, образованного N-ацетилглюкозамином (G) и N-ацетилмурамовой кислотой (M), в положении 3 которой присоединен через линкер пентапептид, а также длинного бактериопренольного хвоста, соединенного с головкой через пиррофосфат (см. рис. 1В). Пиррофосфатный остаток липида-II распознается N-концевым фрагментом низина, содержащим кольца А и В [3], а С-конец низина (лантиониновые кольца С, D и E) проникает в бактериальную мембрану [4]. Как показывают эксперименты, в результате образуется поровый комплекс низин-липид-II в стехиометрическом соотношении 8:4 [5], что приводит к деполаризации мембраны и гибели клетки. Поскольку изменить консервативный пиррофосфатный участок существенно сложнее, чем заменить в составе белка одну аминокислоту другой, использование подобных веществ в клинической практике может быть особенно перспективным в отношении предотвращения или отсрочки развития резистентности у бактерий.

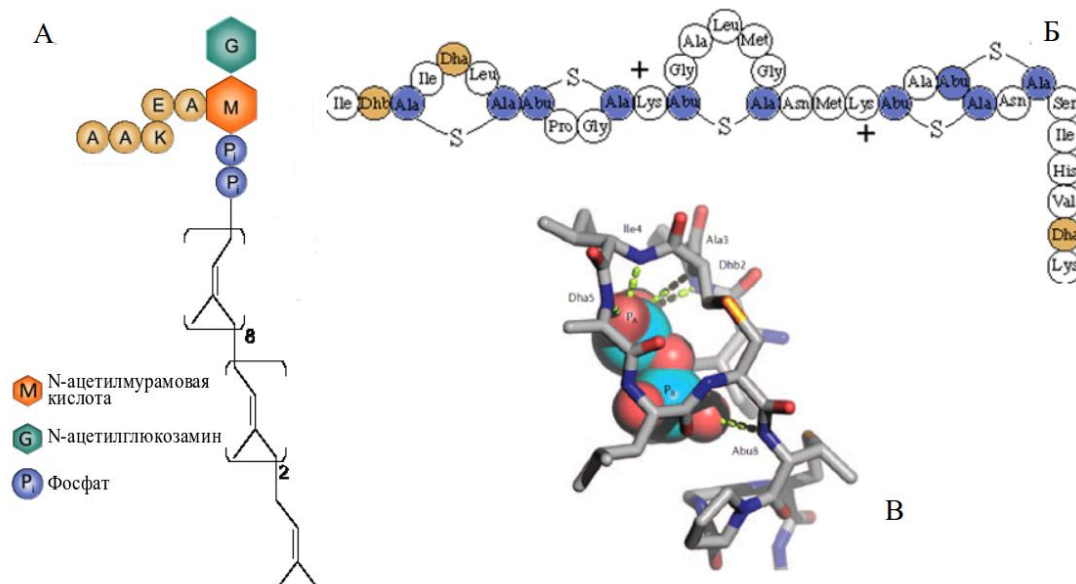


Рисунок 1 – **A** – структура липида-II; **B** – структура низина, в состав которого входят нестандартные аминокислотные остатки лантионин (Ala-S-Ala), метиллантионин (Abu-S-Ala), дегидроаланин (Dha) и дегидроаминобутерин (Dhb); **В** – структура комплекса низина с липидом-II в ДМСО [3]

Методом ЯМР спектроскопии установлена пространственная структура комплекса низина с липидом-II в неполярном растворителе – диметилсульфоксиде (ДМСО) [3], из которой был выявлен основной мотив связывания – кольца А и В низина образуют «ловушку» вокруг пирофосфата молекулы липида-II при помощи пяти межмолекулярных водородных связей (рис. 1С). Однако на поверхности мембраны, в сильно ограниченных стерических условиях структура комплекса может отличаться. Предсказание структуры комплекса в липидном бислое при помощи компьютерного моделирования является важным шагом на пути создания новых бактерицидных средств.

В настоящей работе мы изучали структурно-динамические свойства индивидуальных молекул в их естественной среде: низина в водном растворе и липида-II в бактериальной мембране, а также их комплекса в воде и ДМСО. Основной задачей являлось выявление областей перекрытия конформационных пространств изолированных и связанных в комплекс молекул, с целью последующей сборки комплекса на поверхности бислоя.

Для изучения структурно-динамических свойств антибиотика низин и его мишени, а также для уточнения механизма межмолекулярного распознавания, была проведена серия расчетов молекулярной динамики (МД) в программном пакете GROMACS версии 5.0.4 с использованием параметров тяжелоатомного силового поля (Gromos G43a2). Для анализа локальных свойств мембраны использовали разработанную в лаборатории программу SOMBRERO, реализованная на языке Python с отдельными модулями, написанными на C++.

Было проведено по три независимых вычислительных эксперимента для липида-II в окружении липидного бислоя продолжительностью 400 нс и 1 мкс. Моделируемый липидный бислой представлял собой смесь пальмитоилолеилфосфатидилглицерина (ПОФГ) с пальмитоилолеилфосфатидилэтаноламином (ПОФЭ) в соотношении 3:1, что соответствует составу мембран грамположительных бактерий [6]. Кроме того, был проведен расчет МД изолированной молекулы низина, а также комплекса низина с липидом-II в водном растворе и в ДМСО: по 4 независимых траектории длиной 100 нс. В качестве стартовой структуры использовали установленную методом спектроскопии ЯМР структуру комплекса (PDB ID: 1WCO) [3].

В полученных наборах траекторий комплекса низина с липидом-II анализировали локальную подвижность остатков, общие изменения структуры за время расчета, наличие предпочтительных конформаций «ловушки», а также образование водородных связей с атомами пирофосфата. Несмотря на одинаковую стартовую структуру, комплекс по-разному эволюционировал в каждом из независимых запусков МД, тем не менее, основные отличия определяются выбором растворителя. В среднем по траекториям число одновременных водородных связей колеблется от 3 до 7 в воде и от 6 до 8 в ДМСО. Карты межмолекулярных водородных связей пирофосфата с NH-группами основной цепи низина в комплексе представлены на рисунке 2.

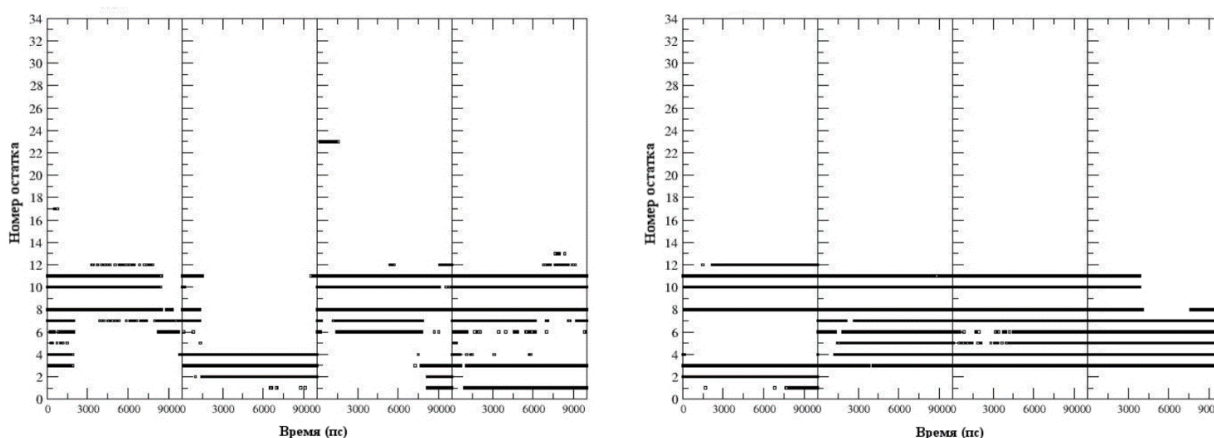


Рисунок 2 – Карта межмолекулярных водородных связей аминокислотных остатков низина (номера а.к. указаны вдоль вертикальной оси) и пирофосфата в воде (слева) и в ДМСО (справа). Вертикальные линии отделяют четыре независимых запуска МД

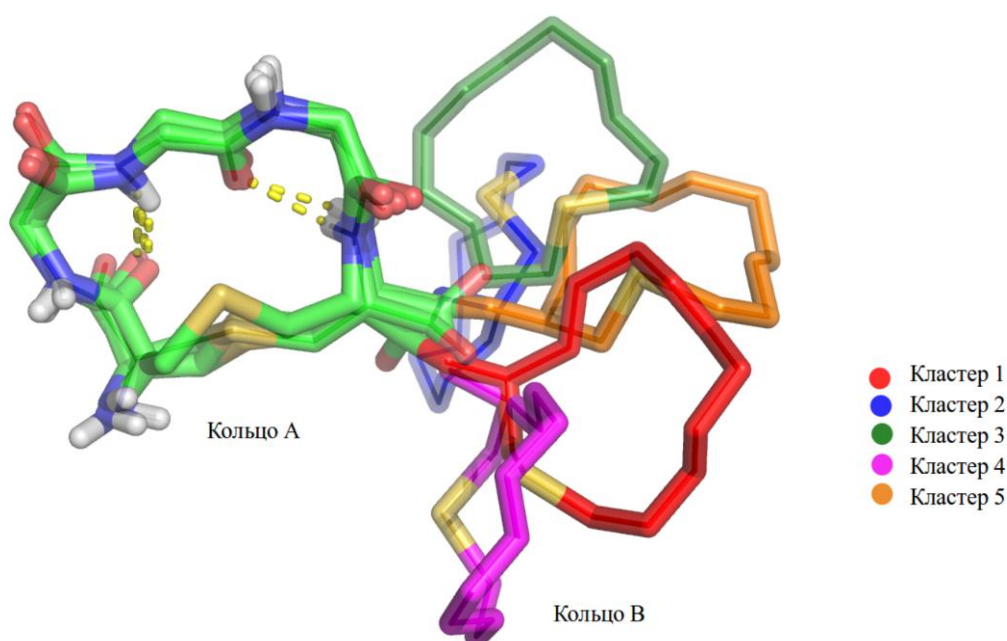


Рисунок 3 – Конформации колец А и В низина в растворе, совмещенные по NH-группам кольца А. Показан ход основных цепей кольца А и кольца В (для наглядности атомы О и Н не отражены). Пунктирными линиями обозначены водородные связи. Кластеры пронумерованы в порядке убывания их заселенности

Кластерный анализ рассчитанных траекторий низина выявил пять основных мотивов взаимной ориентации колец А и В, формирующих «ловушку» для пирофосфата. Интерес представляет собой пространственная ориентация доноров водородных связей, поскольку в образовании комплекса с липидом-II участвуют только NH-группы основной цепи. По их расположению в пространстве был проведен кластерный анализ траекторий отдельно для первого и второго колец «ловушки» (см. рис. 3).

Кольца А и В несвязанного в комплекс низина свободно вращаются друг относительно друга вокруг области, образованной остатками Ala7 и Abu8, выполняющей роль шарнира. Первое кольцо обладает жесткой структурой с характерными сонаправленными протонами NH-групп, за счет образования стабильных внутримолекулярных связей между остатками Ala3 и Dha5 (времена жизни составляют 89 % и 77 % длины траектории в воде и в ДМСО, соответственно) и Dha5 и Ala7 (52 % и 17 %, соответственно). Из-за высокой конформационной подвижности второго кольца, не удалось выявить характерные положения NH-групп его основной цепи.

Молекула липида-II расположена в бислое таким образом, что ее головка «лежит» на поверхности бислоя, пирофосфатная группа расположена на границе раздела двух фаз, а изопреноидная цепь свободно перемещается внутри гидрофобной части мембраны. Первая половина хвоста (5 звеньев, отсчитывая от пирофосфата) проникает внутрь по направлению к центру мембраны под наклоном к плоскости бислоя $149 \pm 12^\circ$. Оставшиеся 6 звеньев более подвижны. Наиболее характерная конформация хвоста, наблюдающаяся во всех рассчитанных

МД – «L-образная» – когда его вторая половина расположена между двух монослоев (~ 71 % длины траектории), однако его конец может также находиться около противоположной поверхности мембраны («I-образная» конформация, ~ 15 %) или даже на той же, что и головка молекулы («V-образная» конформация, ~ 14 %).

Для пирофосфатной группы молекулы липида-II в бислое можно выделить три основных конформации, отличающихся друг от друга взаимным расположением головки и хвоста молекулы. Эти состояния описываются значением двугранного угла O-P-P-O, изображенного на рисунке 4, между двумя атомами фосфора и связанными с ними замещенными атомами кислорода. В ходе МД угол принимает значения, равные $63 \pm 13^\circ$ (кластер 1), $-61 \pm 12^\circ$ (кластер 2) и $176 \pm 10^\circ$ (кластер 3).

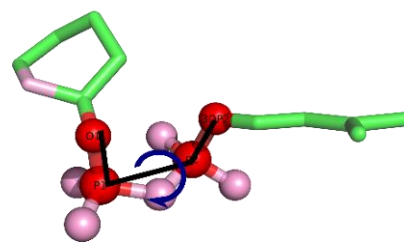


Рисунок 4 – Двугранный угол O-P-P-O

Анализ динамических характеристик поверхности липидного бислоя выявил, что вблизи липида-II наблюдается двустороннее утончение мембраны. На одной стороне мембраны образуется полукруглое углубление около пирофосфата с противоположной стороны от головки молекулы, время жизни которой составляет от 100 до 300 нс (см. рис. 5А), тогда как на другой стороне мембраны размер и положение углубления определяются, по-видимому, движением хвоста липида-II. Гидрофобные свойства поверхности бислоя были исследованы методом молекулярного гидрофобного потенциала (МГП). Как было показано ранее [7], в присутствии липида-II на поверхности ПОФГ/ПОФЭ мембраны образуется долгоживущая амфифильная область (см. рис. 5В), образуемая за счет наклона головок фосфолипидов, а также выталкивания на поверхность их ацильных цепей высокоподвижным хвостом липида-II. Несмотря на то, что в мембране без липида-II время от времени наблюдаются нарушения структуры, его присутствие стабилизирует эти нарушения и увеличивает их времена жизни. Мы предполагаем, что липиды мембраны являются непосредственными участниками процесса распознавания молекулой-«ловушкой» ее мишени.

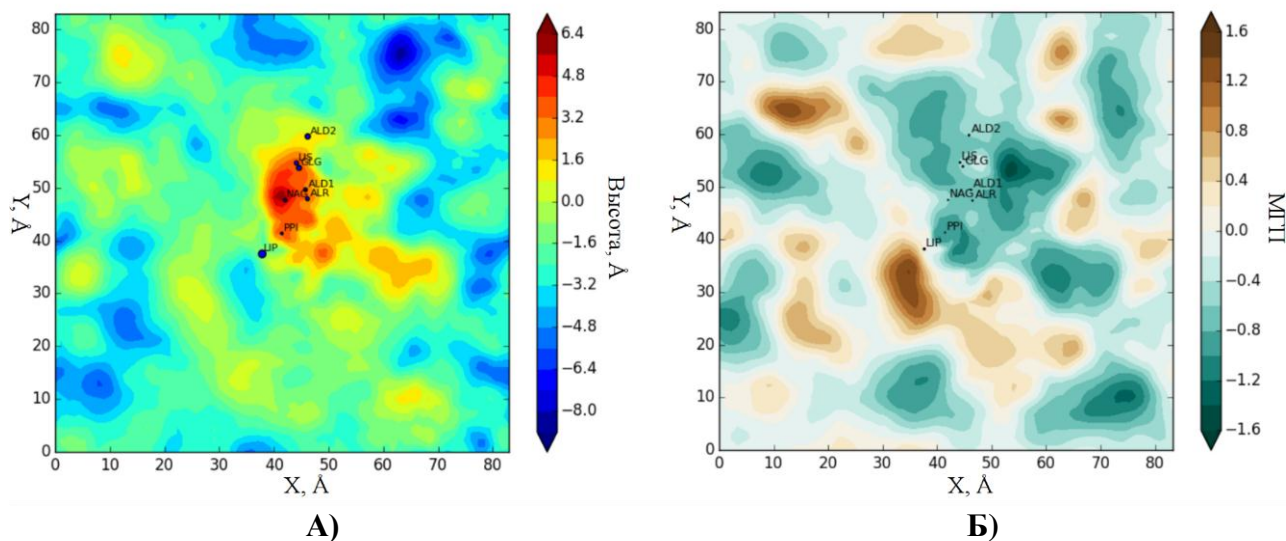


Рисунок 5 – Локальные свойства мембраны. А – Карта усредненных по времени высот поверхности липидного бислоя вблизи молекулы липида-II. Цветовая шкала отражает рельеф поверхности: синий цвет соответствует локальным углублениям, красный – возвышенностям; Б – пространственное распределение среднего по траектории МД молекулярного гидрофобного потенциала поверхности. Коричневый цвет соответствует областям с гидрофобными свойствами, голубой – гидрофильными. На картах отмечено усредненное положение частей молекулы липида-II

Сравнительный анализ свободной и связанной «ловушки» показал, что лишь одно из 5 состояний (кластер 4) изолированного низина напоминает его структуру в комплексе с липидом-II в воде. За счет образования межмолекулярных связей для комплекса характерно сближение колец А и В, не реализующееся в свободном состоянии. В растворе ДМСО кольца подходят друг к другу наиболее близко: $0.71 \pm 0.02 \text{ \AA}$, что компенсируется образованием водородных связей с участием максимально возможного числа аминокислотных остатков, тогда как для свободной ловушки характерное расстояние между центрами масс двух колец составляет $0.95 \pm 0.02 \text{ \AA}$. Высокая конформационная подвижность кольца В и свободное вращение колец относительно друг друга дают возможность предположить, что захват мишени индуцирует структурное изменение «ловушки».

В результате поиска аналогичных найденным в мембране структур липида-II в комплексе было установлено, что кластеры 1 и 2 пирофосфатной группы липида-II в мембране реализуются в ходе МД комплекса. Поскольку, помимо структурного соответствия, пирофосфатная группа должна быть «видна» на поверхности бислоя, внутри кластеров 1 и 2 провели анализ ее положения относительно фосфатов липидов, а также степени

экспонированности ее атомов в водную среду. В результате были отобраны долгоживущие (~50-100 нс) состояния, которые теоретически подходят для захвата «ловушкой».

Совмещением структур комплекса в растворе с выбранными состояниями липида-II в мембране по пирофосфатной группе в большинстве случаев были получены потенциально возможные, стерически не затрудненные модели. Расчет МД длиной 100 нс показал их стабильность на поверхности бислоя. Следующим этапом станет изучение структурно-динамических свойств полученных систем.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 14-14-00871).

Список литературы / References:

1. Breukink E., Wiedemann I., Van Kraaij C., Kuipers O.P., Sahl H.-G., de Kruijff B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, 1999, vol. 286, pp. 2361-2364.
2. Breukink E., de Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006, vol. 5, pp. 321-332.
3. Hsu S.-T.D., Breukink E., Tischenko E., Lutters M.A.G., de Kruijff B., Kaptein R., Bonvin A.M.J., van Nuland N.A.J. 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.
4. Breukink E., Van Kraaij C., Demel R.A., Siezen R.J., Kuipers O.P., de Kruijff B. 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.
5. Hasper H. E., de Kruijff B., Breukink E. Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochemistry*, 2004, vol. 43, pp. 11567-75.
6. 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.
7. Chugunov A., Pyrkova D., Nolde D., Polyansky A., Pentkovsky V., Efremov R. Lipid-II forms potential «landing terrain» for lantibiotics in simulated bacterial membrane. *Sci. Rep.*, 2013, vol. 3, p. 1678.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА МОЛЕКУЛЫ CYS-ARG-GLU-LYS-ALA

Аббасова Г.Д., Гаджиева Л.С.

Бакинский государственный университет
ул. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ 1148, Азербайджан
e-mail: lala-h@mail.ru

Аннотация. Полуэмпирическим методом квантовой химии CNDO и методами молекулярной динамики исследованы электронная структура, молекулярно-динамические и электронно-конформационные свойства молекулы CREKA. Были выявлены относительно консервативные и чувствительные к конформационным перестройкам участки молекулы.

Ключевые слова: CREKA, конформация, пептидные молекулы, метод CNDO, конформационно-динамических свойства.

MOLECULAR DYNAMICS OF THE MOLECULES CYS-ARG-GLU-LYS-ALA

Abbasova G.J. Hajiyeva L.S.

Baku State University
Optics and Molecular Physics Department
St.23,Z.Khalilov, AZ 1148, Baku, Azerbaijan
e-mail: lala-h@mail.ru

Abstract. The electronic structure, molecular dynamics and conformational properties of electron-molecule CREKA are researched by Half-empirical methods of quantum chemistry CNDO and methods of molecular dynamics. Relatively conservative and sensitive to conformational rearrangements portions of the molecule have been identified.

Key words: CREKA, conformation, the peptide molecule, CNDO method, conformational and dynamic properties.

Введение.

В 2006 году американскими учеными был синтезирован новый лекарственный препарат, обладающий ярко выраженным противоопухолевым эффектом в отношении рака простаты [1-6]. Этот препарат, в химической структуре которого имеется пять последовательно соединенных аминокислотных остатков цистеин (С), аргинин (R), глутаминовая кислота (E), лизин (K) и аланин (A) получил название CREKA. Ранее нами были исследованы конформационные свойства и изучена динамика боковых цепей молекулы в условиях неявно заданного водного окружения. В данной работе методами квантовой химии и молекулярной динамики исследованы электронно-конформационные и молекулярно-динамические свойства молекулы CREKA [1, 3, 4].

Методы расчета.

Электронная структура молекулы CREKA, парциальные заряды на атомах, распределение электронной плотности, электрический дипольный момент и другие параметры были исследованы полуэмпирическим методом квантовой химии CNDO, а динамические свойства - изучены методом молекулярной динамики. При оптимизации электронной энергии молекулы в качестве нулевых приближений были рассмотрены равновесные