

УДК 577.151.34; 577.151.64

## МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА ОПТАКТИНА В НОВОМ САЙТЕ В СТРУКТУРЕ НЕЙРАМИНИДАЗЫ А ИЗ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Я.А. Шарапова<sup>1</sup>, В.К. Швядас<sup>2\*</sup>

(Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, <sup>1</sup>факультет биоинженерии и биоинформатики; <sup>2</sup>НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского; \*e-mail: vytas@belozersky.msu.ru)

Нейраминидаза А (NanA) патогенной бактерии *Streptococcus pneumoniae*, катализирующую отщепление концевых остатков сиаловой кислоты олигосахаридных рецепторов, расположенных на поверхности клеток дыхательного эпителия человека, принято считать ключевым фактором вирулентности. Поиск новых центров связывания регуляторных лигандов в структуре этого фермента представляет фундаментальный интерес и может дать ключ к разработке лекарственных средств от пневмонии, менингита и других инфекционных заболеваний человека. Недавно было обнаружено, что низкомолекулярное вещество оптактин, являясь ингибитором активности родственной нейраминидазы В (NanB), может связываться на отдельном участке в структуре фермента, топологически независимом от каталитического центра. В данной работе биоинформатический и структурный анализ использовали для аннотации подобного участка связывания в структуре NanA и установления особенностей его структурной организации. Связывание оптактина гомологичными нейраминидазами NanA и NanB изучали, используя методы молекулярного моделирования. Выявлены остатки Tyr250, Thr251, Lys334, Gln494, Lys499, Lys597, Thr657 и Glu658, принимающие участие в стабилизации оптактина в структуре NanB; обнаружена важная роль молекул воды в координации лиганда. Установлено, что связывание NanA с оптактином затрудняет замена аминокислотных остатков в ключевых позициях данного участка связывания. Выявленные особенности структурной организации ранее неизвестного участка связывания в структуре NanA позволяют вести целенаправленный поиск комплементарных лигандов, способных селективно регулировать активность этого фермента.

**Ключевые слова:** аллостерический центр, бактериальные нейраминидазы из *Streptococcus pneumoniae*, NanA, NanB, ингибитор оптактин, биоинформатический анализ, молекулярное моделирование.

Пневмококки (*Streptococcus pneumoniae*) – грамположительные бактерии, обитающие в носоглотке большинства людей и в норме не вызывающие заболеваний, поскольку постепенно уничтожаются иммунной системой здорового человека [1]. Однако при ослаблении иммунитета бактерии из носоглотки могут попасть в нижние (в норме стерильные) участки респираторного тракта, что вызывает сильную воспалительную реакцию [2]. Дальнейшее проникновение пневмококков через дыхательный эпителий в другие ткани организма может вызвать отит среднего уха, синусит, а также такие угрожающие жизни заболевания, как менингит и сепсис [3]. Ключевой фазой пневмококковой колонизации носоглотки является формирование организованной биопленки на поверхности дыхательного эпителия [4].

Нейраминидазы, будучи ключевыми факторами вирулентности *S. pneumoniae*, способствуют колонизации бактерий, отрезая концевые остатки сиаловой кислоты олигосахаридных рецепторов на поверхности клеток дыхательного эпителия человека. Под действием нейраминидаз высвобождаются рецепторы для бактериальной адгезии, а также снижается вязкость слоя слизи, покрывающего дыхательный эпителий. Продукт нейраминидазной активности – сиаловая кислота – используется бактериями в качестве источника питания, а также служит сигналом к образованию биопленки.

Геном разных штаммов *S. pneumoniae* может кодировать до трех гомологичных нейраминидаз (NanA, NanB и NanC), имеющих существенные различия в аминокислотной последовательности,

субстратной специфичности и типе катализируемой реакции [5]. Конкретная роль каждой из трех нейраминидаз плохо изучена. Проведенные исследования не выявили участия NanC в развитии пневмококковой инфекции, однако было установлено, что NanA и NanB играют важную роль в патогенезе *S. pneumoniae*. Эксперименты на животных с использованием мутантов пневмококка, дефектных по генам NanA и NanB, показали, что патогенность таких мутантов сильно падает, при этом нейраминидаза NanB способна лишь частично компенсировать отсутствие NanA [6, 7]. Установлено, что NanA присутствует у всех штаммов *S. pneumoniae*, в то время как NanB и NanC есть лишь у 96 и 51% штаммов соответственно [8]. Ферментативная активность нейраминидазы NanA значительно выше, чем активность NanB и NanC, уровень экспрессии у NanA значительно выше, чем у NanB [5, 7, 9].

Нейраминидазы NanA и NanB считаются перспективными мишенями будущих лекарств, поэтому предпринимаются значительные усилия для поиска химических соединений, способных ингибировать эти ферменты [10–14]. Однако в большинстве случаев поиск ингибиторов основан на их связывании в активных центрах. В последние годы усиливается интерес к феномену аллостерии – регуляции функции белков при связывании низкомолекулярных эффекторов в регуляторных центрах, которые топологически независимы от функциональных (активных) центров [15, 16]. С одной стороны, это связано с появлением доказательств более широкой, чем ранее предполагалось, распространенности этого явления в природе [17]. С другой стороны, для аллостерических центров характерна более высокая варибельность по сравнению с более консервативными активными центрами [18], что открывает возможности для дизайна селективных регуляторных лигандов. До настоящего времени в структуре бактериальной NanA не было охарактеризовано ни одного аллостерического центра. В 2013 г. было обнаружено ингибирующее действие низкомолекулярного лиганда оптактина на каталитическую активность фермента NanB [19], а в 2016 г. кристаллические структуры соответствующего комплекса были опубликованы в базе данных PDB (записи 4XHX и 4XJW). Структурный анализ показывает, что оптактин связывается в отдельном участке, который топологически независим от активного центра NanB, однако молекулярный механизм аллостерического ингибирования NanB в литературе не описан, а влияние

оптактина на родственный и структурно схожий фермент NanA не исследовано.

В данной работе методы молекулярного моделирования и биоинформатики были использованы для изучения связывания оптактина бактериальными нейраминидазами NanA и NanB из *S. pneumoniae*, выявления аминокислотных остатков, определяющих эффективность взаимодействия ферментов с ингибитором, а также для получения характеристики ранее неизвестного участка связывания лигандов в структуре NanA.

## Методы

**Биоинформатический анализ и поиск центров связывания.** Структурно-опосредованное множественное выравнивание структур и последовательностей представителей суперсемейства сиалидаз, в том числе нейраминидаз NanA и NanB, было построено сервером Mustguseal (<https://biokinet.belozersky.msu.ru/mustguseal>) в соответствии с ранее описанным протоколом [18]. На первом этапе с использованием программы МАТТ [20] было построено структурное выравнивание избыточной (на уровне 90% идентичности по последовательности) выборки из 27 белков, отнесенных к суперсемейству сиалидаз в соответствии с классификацией CATN (ID 2.120.10.10). Полученное структурное выравнивание было расширено за счет добавления последовательностей родственных сиалидаз/нейраминидаз из баз данных Swiss-Prot и TrEMBL с помощью сервера Mustguseal в режиме «Mode 2». В результате автоматического применения комбинации методов сравнения аминокислотных последовательностей белков [21–25] было построено выравнивание 814 представителей суперсемейства сиалидаз, которые характеризуются различными функциональными свойствами в рамках общей структурной организации. Построенное выравнивание и структура NanA из *S. pneumoniae* (PDB 2YA8) были проанализированы с помощью метода pocketZebra [18, 26] для предсказания специфических позиций и аннотации центров связывания.

**Подготовка полноатомных моделей.** Структуру оптактина ((1s,3R,4S)-1-[(циклогексиламино)метил]-3,4-дигидроксициклопентансульфо кислоты) построили в программе ChemSketch v.12.01 [27] и оптимизировали с использованием программы квантовой химии Firefly (<http://classic.chem.msu.su>). Для расчета зарядов использовали пакет R.E.D. tools [28], остальные параметры были взяты из силового поля GAFF.

Для подготовки моделей пневмококковых нейраминидаз использовали кристаллографическую структуру NanB из *S. pneumoniae* в комплексе с оптактином (PDB 4XHX) и структуру NanA из *S. pneumoniae* без оптактина (PDB 2YA8). Для подготовки начальной модели комплекса NanA с оптактином проводили структурное выравнивание аллостерического центра в NanB (4XHX) и нового центра в NanA (2YA8), после чего координаты лиганда копировали из одной структуры в другую. Модифицированную версию PDB2PQR v. 1.9.0 [29], совместимую с PROPKA v. 3.1 [30], использовали для оценки значений  $pK_a$  ионизируемых групп белка и добавления атомов водорода при физиологическом значении pH.

**Протокол молекулярной динамики.** Начальные модели комплексов NanA и NanB с оптактином помещали в кубическую ячейку с растворителем (использовали модель воды TIP4P-Ew и расстояние от белка до края периодической ячейки не менее 12 Å). Пакет AmberTools v.15 применяли для параметризации систем в силовом поле FF14SB [31]. Для каждого комплекса фермент–ингибитор рассчитывали три независимые молекулярно-динамические траектории. Использовали протокол классической молекулярной динамики, описанный в [32]. Сначала энергию системы минимизировали, затем накладывали позиционные ограничения в 3 ккал/моль/Å<sup>2</sup> на все тяжелые атомы комплекса и проводили нагрев системы от 0 до 300 К в течение 500 пс при постоянном объеме. Далее позиционные ограничения снимали при постоянном давлении 1 атм и температуре 300 К, при этом к концу периода релаксации плотность системы, температура и общая энергия выходили на плато. Для полученных систем проводили свободные молекулярно-динамические симуляции (т.е. без позиционных ограничений) при постоянном объеме и температуре 300 К длительностью 10–30 нс каждая, с шагом интегрирования 2 фс. Радиус отсечения нековалентных взаимодействий составлял 10 Å, для расчета электростатических взаимодействий в периодической системе использовали метод PME [33]. Для поддержания температуры в течение свободной динамики применяли термостат Ланжевена. Расчет стадий минимизации энергии, нагрева и релаксации проводили на локальных GPU-ускорителях «GeForce GTX 980 Ti», расчет свободных динамик выполняли на ускорителях «Tesla K40» суперкомпьютера «Ломоносов-2».

**Оценка свободной энергии связывания.** Для оценки свободной энергии связывания оптактина

в аллостерическом центре NanB и новом участке связывания NanA использовали модели комплексов фермент–ингибитор в воде после оптимизации их геометрии с применением методов минимизации энергии. Для ускорения вычислений все молекулы растворителя, которые находились на расстоянии более 5 Å от лиганда, были удалены. Расчет выполняли с помощью программы AutoDock 4.2.6 [34].

## Результаты

Биоинформатический анализ и молекулярное моделирование использовали для изучения связывания оптактина в структурах гомологичных нейраминидаз пневмококка. Сравнительный анализ показал, что нейраминидазы NanA и NanB из *Streptococcus pneumoniae* характеризуются высокой степенью структурного сходства каталитических доменов (85% совпадений элементов вторичной структуры) и низкой степенью идентичности последовательностей (23% совпадений аминокислотных остатков при парном выравнивании). Методом pocketZebra на основании анализа множественного структурно-опосредованного выравнивания суперсемейства сиалидаз было показано, что в структурах обоих ферментов присутствует похожий участок связывания, топологически независимый от активного центра, с высоким содержанием специфических позиций, что свидетельствует о важности этого участка связывания для функционирования ферментов. Молекулярное моделирование показало, что в стабилизации оптактина в структуре NanB принимают участие остатки Tyr250, Thr251, Lys334, Gln494, Lys499, Lys597, Thr657 и Glu658, при этом важную роль в координации лиганда играют также молекулы воды. Однако в NanA соответствующие остатки в этом участке связывания заменены на другие аминокислоты, что препятствует связыванию оптактина.

**Биоинформатический анализ и поиск центров связывания.** Для поиска и аннотации участков связывания в структуре NanA из *S. pneumoniae* проводили биоинформатический анализ суперсемейства сиалидаз с помощью программы pocketZebra. Метод основан на определении специфических позиций, консервативных внутри функциональных подсемейств, но различающихся между ними в большом множественном выравнивании гомологов, и ранжировании полостей/карманов на поверхности структур белков в соответствии с предсказанной специфичностью. Структурный анализ известных каталитических и аллостерических центров показывает, что они

обогатены специфическими позициями, которые играют ключевую роль в формировании функционального разнообразия в суперсемействах (например, способности превращать разные субстраты) [18]. Проведенный нами биоинформатический анализ суперсемейства сиалидаз показал высокое содержание специфических позиций в каталитическом центре (рис. 1, Pocket 1), а также в ранее не охарактеризованном участке связывания (рис. 1, Pocket 2) в структуре NanA, который расположен на противоположной стороне  $\beta$ -пропеллера каталитического домена фермента. Сравнительный анализ показал, что Pocket 2 в структуре NanA эквивалентен участку связывания ингибитора оптактина в кристаллографическом комплексе гомологичного фермента NanB (PDB 4XHX). Таким образом, наличие двух центров связывания в противоположных воронках каталитического домена можно считать свойством не только NanA, но и других нейраминидаз, а высокое содержание специфических позиций в этом участке связывания позволяет предположить его важность для функциональных свойств этих ферментов.

**Связывание оптактина в аллостерическом сайте NanB из *S. pneumoniae*.** Молекулярное моделирование было использовано для изучения связывания оптактина в аллостерическом участке связывания NanB. Показано, что ориентация лиганда остается неизменной на протяжении 10 нс молекулярно-динамической траектории и в целом соответствует его положению в кристалле 4XHX (рис. 2). Среднеквадратичное отклонение (RMSD) оптактина от его первоначального положения в течение всего периода симуляции в среднем составило 1,15 Å, что идентично среднему значению RMSD 1,14 Å для всех тяжелых атомов белка за аналогичный период симуляции. Стабилизация лиганда в структуре фермента обеспечивается за счет водородных и ионных связей между его функциональными группами и аминокислотными остатками фермента, в которых важную роль играют молекулы растворителя (рис. 3). Дигидроксициклопентильная группа ингибитора образует водородные связи с остатками Thr251, Gln494, Thr657 и формирует гидрофобный контакт с ароматической группой Tyr250. Вторичная аминогруппа лиганда

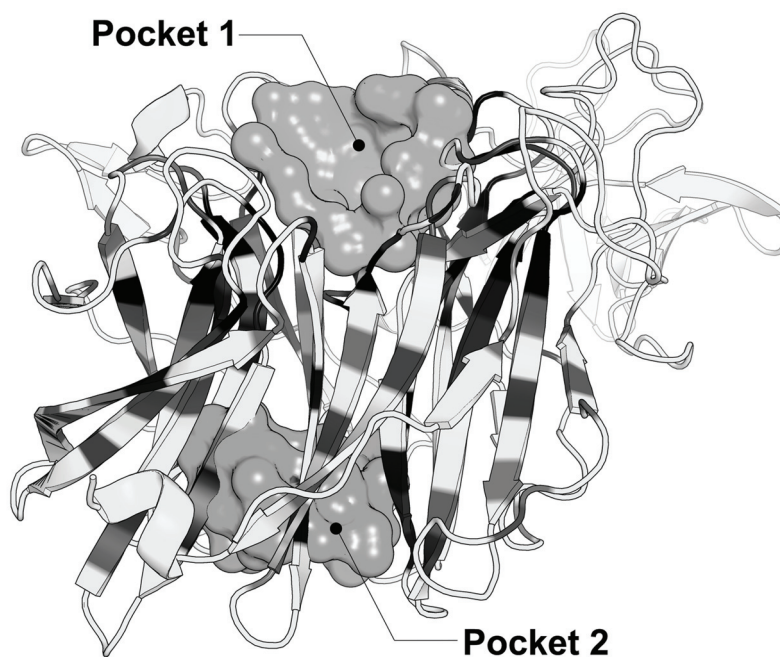


Рис. 1. Участки связывания лигандов в структуре NanA из *S. pneumoniae* (PDB 2YA8), предсказанные методом pocketZebra на основании биоинформатического анализа суперсемейства сиалидаз. Pocket 1 соответствует ранее описанному каталитическому центру, Pocket 2 – ранее не охарактеризованному участку связывания в структуре NanA. Нумерация участков связывания соответствует ранжированию pocketZebra. Градиентная окраска основной цепи белка соответствует статистической оценке специфичности позиций в колонках множественного выравнивания суперсемейства сиалидаз (более темный цвет соответствует более высокой степени специфичности). Иллюстрация подготовлена с использованием программы PyMol

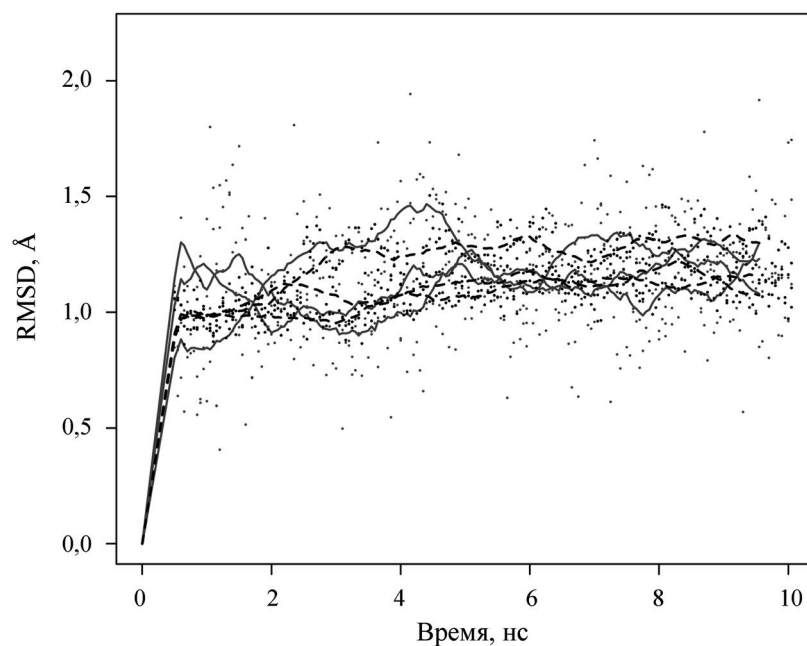


Рис. 2. Среднеквадратичное отклонение (RMSD) ингибитора оптактина в аллостерическом участке связывания NanB из *S. pneumoniae* в процессе молекулярно-динамической симуляции. При расчете RMSD учитывали только тяжелые атомы оптактина (серая сплошная линия, серые точки) и тяжелые атомы основной цепи белка (черная пунктирная линия, черные точки). Приведены результаты расчета трех траекторий. Точки соответствуют значениям RMSD, линии соответствуют усредненным значениям с шагом 1 нс. Иллюстрация подготовлена с использованием пакета R

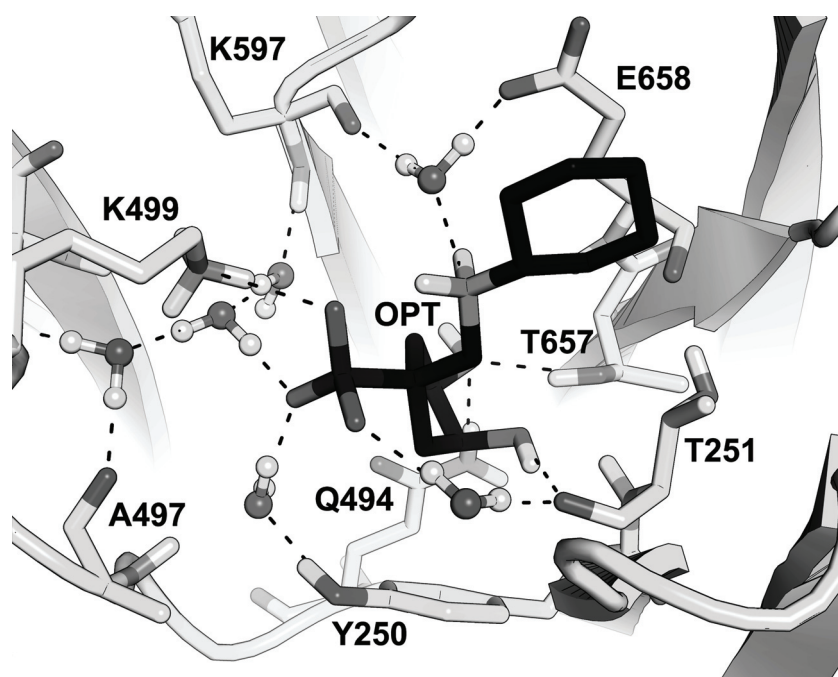


Рис. 3. Связывание ингибитора оптактина (OPT в центре) в аллостерическом участке связывания NanB из *S. pneumoniae*. Пунктирными линиями изображены водородные и ионные связи между аминокислотными остатками белка и оптактином, в том числе с участием молекул воды. Нумерация аминокислотных остатков приведена в соответствии с PDB 4XHX. Иллюстрация подготовлена с использованием программы PyMol

взаимодействует с Lys597 и Glu658 опосредованно через молекулу воды. Сульфогруппа координируется тремя водородными связями с участием молекул воды и остатков Tyr250, Thr251, Ala497 и Lys597. Кроме того, моделирование показало,

что сульфогруппа оптактина дополнительно стабилизируется одним ионным мостиком, в образовании которого по очереди участвуют остатки Lys334 и Lys499 (рис. 4). Циклогексильная группа оптактина формирует контакт с гидрофобной

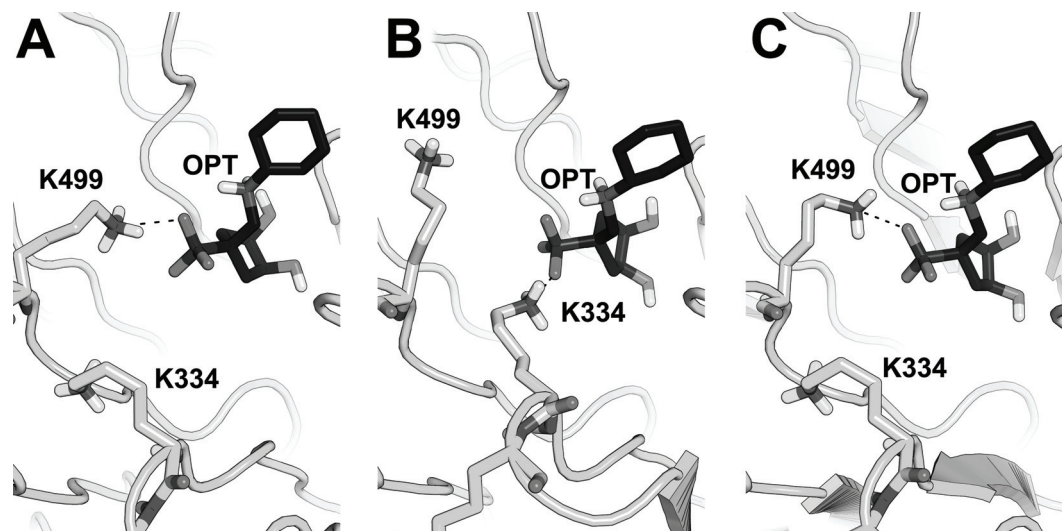


Рис. 4. Координация сульфогруппы оптактина (OPT) в аллостерическом участке связывания NanB из *S. pneumoniae* с участием Lys334 и Lys499 – на 1 нс (А), 5 нс (В) и 8,5 нс (С) молекулярно-динамической симуляции. Нумерация аминокислотных остатков приведена в соответствии с PDB 4XHX.

Иллюстрация подготовлена с использованием программы PyMol

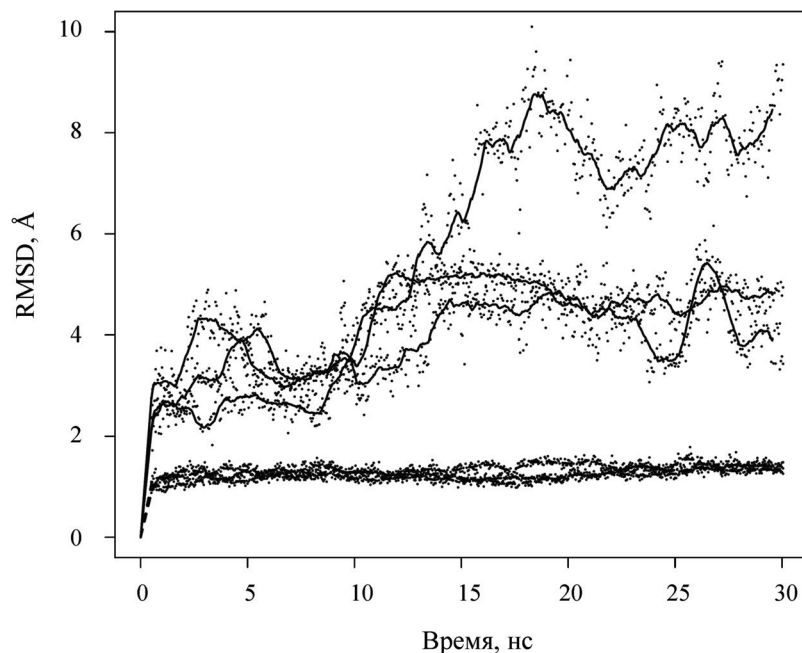


Рис. 5. Среднеквадратичное отклонение (RMSD) тяжелых атомов оптактина в новом участке связывания NanA из *S. pneumoniae* в процессе молекулярно-динамической симуляции. При расчете RMSD учитывали только тяжелые атомы оптактина (серая сплошная линия) и тяжелые атомы основной цепи белка (черная пунктирная линия). Приведены результаты расчета трех траекторий. Точки соответствуют значениям RMSD, линии соответствуют усредненным значениям с шагом 1 нс. Иллюстрация подготовлена с использованием пакета R

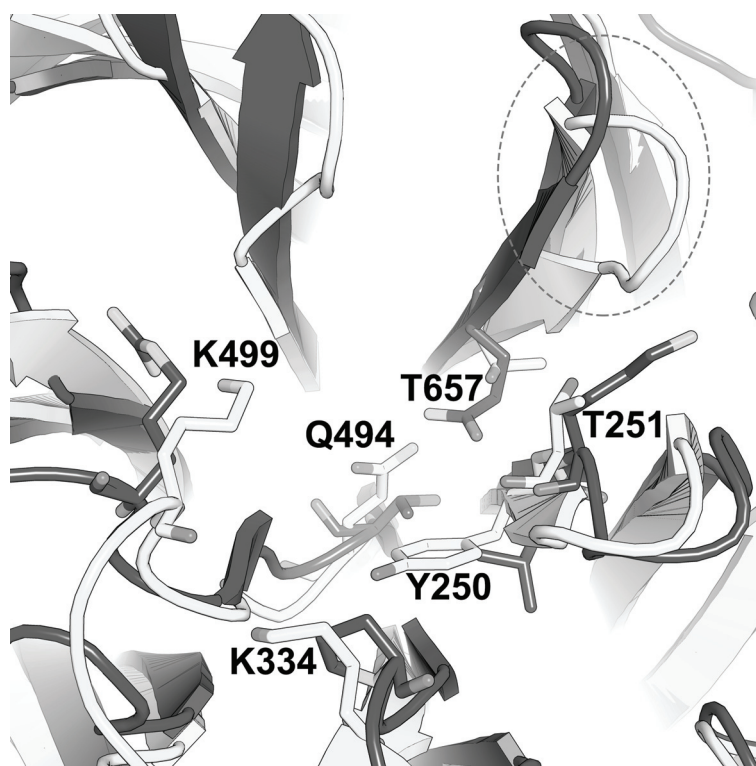


Рис. 6. Структурное выравнивание нового участка связывания в NanA (более темный окрас основной цепи) и аллостерического участка связывания в NanB (более светлый окрас основной цепи) из *S. pneumoniae*. Палочками показаны аминокислотные остатки в структуре NanB, которые участвуют в связывании оптактина, и соответствующие им остатки в структуре NanA. Пунктиром обведен  $\beta$ -поворот, ориентация которого в структурах NanA и NanB отличается (см. объяснение в тексте). Нумерация аминокислотных остатков приведена в соответствии с PDB 4XHX. Иллюстрация подготовлена с использованием программы PyMol

поверхностью аминокислотных остатков, расположенных у основания  $\beta$ -поворота 658–664. Оценка свободной энергии связывания оптактина в описанной ориентации в структуре NanB составила  $-11,17$  ккал/моль.

**Связывание оптактина в новом участке связывания в структуре NanA из *S. pneumoniae*.**

Изучение возможностей связывания оптактина в новом участке связывания в структуре NanA (рис. 1, Pocket 2) было проведено с помощью методов молекулярного моделирования. Ориентация ингибитора в исходной модели комплекса с NanA была аналогична его ориентации в аллостерическом центре NanB (PDB 4XHX). Оценка свободной энергии связывания оптактина при такой ориентации в структуре NanA составила  $-9,75$  ккал/моль, что на  $1,42$  ккал/моль хуже, чем в NanB. Молекулярное моделирование показало, что связывание лиганда в таком положении в NanA нестабильно. В течение первых 10 нс молекулярно-динамической симуляции среднеквадратичное отклонение (RMSD) оптактина от его первоначального положения составило око-

ло  $5 \text{ \AA}$ , а в течение последующих 20 нс наблюдали либо полную диссоциацию лиганда и его переход в раствор, либо его дальнейшее смещение вдоль поверхности сайта связывания (рис. 5). Сравнительный анализ аллостерического участка связывания в NanB и нового участка связывания в NanA показал, что при схожей структурной организации их воронок аминокислотные остатки, принимающие участие в координации оптактина в NanB, в структуре NanA заменены на остатки с другими физико-химическими свойствами (рис. 6). Остатки Lys334 и Lys499 в NanB, принимающие участие в связывании сульфогруппы, заменены в NanA на Pro409 и Arg562, при этом гуанидиновая группа аргинина образует водородные связи с атомом кислорода основной цепи Gln637 и боковым радикалом Asn639 и, таким образом, ориентирована в противоположную сторону от участка связывания лиганда. Остаток Tyr250 в NanB заменен на Leu337 в NanA, что увеличивает объем центра связывания. Другие ключевые остатки Thr657, Thr251 и Gln494 заменены соответственно на Gln741, Lys338 и Thr557. Кроме того,

β-поворот 658-664, остатки которого образуют в NanB гидрофобный контакт с атомами циклогексильной группы оптактина, в NanA имеет другой аминокислотный состав и другую ориентацию в структуре.

### Обсуждение

Поиск новых участков связывания в структурах белков и комплементарных им лигандов, взаимодействие с которыми позволяет селективно регулировать функциональную активность ферментов – стремительно развивающееся направление биомедицинских исследований. Это связано с фундаментальным интересом к поиску новых путей регуляции белков/ферментов и обусловлено преимуществами аллостерических модуляторов – возможностью создания новых лекарственных средств, обладающих меньшей токсичностью за счет большей селективности связывания и специфичности механизма действия [35–38]. В данной работе биоинформатический анализ был

использован для аннотации нового, ранее не охарактеризованного участка связывания в структуре нейраминидазы А – ключевого фактора вирулентности патогенной бактерии *S. pneumoniae*. Обнаруженный участок связывания обогащен так называемыми специфическими аминокислотными остатками для суперсемейства сиалидаз, что свидетельствует о его важности для функциональных свойств фермента. При этом структурная организация этого участка связывания в нейраминидазе А весьма сильно отличается от структурной организации похожего участка связывания в структуре гомологичной нейраминидазы В, способного связывать аллостерический оптактин. Различие свойств обусловлено заменами специфических аминокислотных остатков, однако сам факт наличия в нейраминидазе А такого участка связывания свидетельствует о возможности создания селективных ингибиторов этого фермента, комплементарных данному участку, и необходимости исследования его функциональной роли.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 15-14-00069) с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова [39].

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hamborsky J., Kroger A., Wolfe C., eds // CDC. The Pink Book: Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases, Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. 2015. Pneumococcal Disease. P. 279.
- Kadioglu A., Weiser J.N., Paton J.C., Andrew P.W. // Nat. Rev. Microbiol. 2008. Vol. 6. N 4. P. 288.
- Bittaye M., Cash P. // Expert Rev. Proteomics. 2015. Vol. 12. N 6. P. 607.
- Bogaert D., de Groot R., Hermans P.W.M. // Lancet Infect. Dis. 2004. Vol. 4. N 3. P. 144.
- Xu G., Kiefel M.J., Wilson J.C., Andrew P.W., Oggioni M.R., Taylor G.L. // J. Am. Chem. Soc. 2011. Vol. 133. N 6. P. 1718.
- Tong H.H., Blue L.E., James M.A., DeMaria T.F. // Infect. Immun. 2000. Vol. 68. N 2. P. 921.
- Manco S., Hernon F., Yesilkaya H., Paton J.C., Andrew P.W., Kadioglu A. // Infect. Immun. 2006. Vol. 74. N 7. P. 4014.
- Pettigrew M.M., Fennie K.P., York M.P., Daniels J., Ghaffar F. // Infect. Immun. 2006. Vol. 74. N 6. P. 3360.
- Berry A.M., Lock R.A., Paton J.C. // J. Bacteriol. 1996. Vol. 178. N 16. P. 4854.
- Walther E., Richter M., Xu Z., Kramer C., Von Grafenstein S., Kirchmair J., Grienke U., Rollinger J.M., Liedl K.R., Slevogt H., Sauerbrei A., Saluz H.P., Pfister W., Schmidtke M. // Int. J. Med. Microbiol. 2015. Vol. 305. N 3. P. 289.
- Walther E., Xu Z., Richter M., Kirchmair J., Grienke U., Rollinger J. M., Krumbholz A., Saluz H.P., Pfister W., Sauerbrei A., Schmidtke M. // Front. Microbiol. 2016. 7. P. 357
- Xu Z., Von Grafenstein S., Walther E., Fuchs J.E., Liedl K.R., Sauerbrei A., Schmidtke M. // Sci. Rep. 2016. Vol. 6. P. 25169.
- Grienke U., Richter M., Walther E., Hoffmann A., Kirchmair J., Makarov V., Nietzsche S., Schmidtke M., Rollinger J.M. // Sci. Rep. 2016. Vol. 6. P. 27156.
- Hoffmann A., Richter M., von Grafenstein S., Walther E., Xu Z., Schumann L., Grienke U., Mair C.E., Kramer C., Rollinger J.M., Liedl K.R., Schmidtke M., Kirchmair J. // Front. Microbiol. 2017. Vol. 8. P. 205.
- Сунлатов Д.А., Шведас В.К. // Acta Naturae. 2015. Vol. 7. N 4. P. 39.
- Goodey N.M., Benkovic S.J. // Nat. Chem. Biol. 2008. Vol. 4. N 8. P. 474.
- Gunasekaran K., Ma B., Nussinov R. // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 2004. Vol. 57. N 3. P. 433.
- Suplatov D., Kirilin E., Arbatsky M., Takhaveev V., Švedas V. // Nucleic Acids Res. 2014. Vol. 42. N W1. P. W344.
- Brear P. // PhD Thesis. University of St Andrews. 2012.
- Menke M., Berger B., Cowen L. // PLoS Comput. Biol. 2008. Vol. 4. N 1. P. e10.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // Nucleic Acids Res. 1997. Vol. 25. N 17. P. 3389.
- Söding J., Biegert A., Lupas A.N. // Nucleic Acids Res. 2005. Vol. 33 (suppl 2). P. W244.
- Vouzis P.D., Sahinidis N.V. // Bioinformatics. 2011. Vol. 27. N 2. P. 182.
- Fu L., Niu B., Zhu Z., Wu S., Li W. // Bioinformatics. 2012. Vol. 28. N 23. P. 3150.



25. *Katoh K., Standley D.M.* // Mol. Biol. Evol. 2013. Vol. 30. N 4. P. 772.
26. *Suplatov D., Kirilin E., Takhaveev V., Švedas V.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2014. Vol. 32. N 11. P. 1752.
27. ACD/ChemSketch Freeware, version 12.01, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2012.
28. *Dupradeau F.Y., Pigache A., Zaffran T., Savineau C., Lelong R., Grivel N., Lelong D., Rosanski W., Cieplak P.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2010. Vol. 12. N 28. P. 7821.
29. *Dolinsky T.J., Czodrowski P., Li H., Nielsen J.E., Jensen J.H., Klebe G., Baker N.A.* // Nucleic Acids Res. 2007. Vol. 35 (suppl 2). P. W522.
30. *Søndergaard C.R., Olsson M.H., Rostkowski M., Jensen J.H.* // J. Chem. Theory Comput. 2011. Vol. 7. N 7. P. 2284.
31. *Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K.E., Simmerling C.* // J. Chem. Theory Comput. 2015. Vol. 11. N 8. P. 3696.
32. *Pierce L.C., Salomon-Ferrer R., de Oliveira C.A.F., McCammon J.A., Walker R.C.* // J. Chem. Theory Comput. 2012. Vol. 8. N 9. P. 2997.
33. *Darden T., York D., Pedersen L.* // J. Chem. Phys. 1993. Vol. 98. N 12. P. 10089.
34. *Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J.* // J. Comput. Chem. 2009. Vol. 16. P. 2785.
35. *Eglen R., Reisine T.* // Pharmacol. Ther. 2011. Vol. 130. N 2. P. 144.
36. *Nussinov R., Tsai C.J., Csermely P.* // Trends Pharmacol. Sci. 2011. Vol. 32. N 12. P. 686.
37. *Nussinov R., Tsai C.J.* // Cell. 2013. Vol. 153. N 2. P. 293.
38. *Wentur C.J., Gentry P.R., Mathews T.P., Lindsley C.W.* // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2014. Vol. 54. P. 165.
39. *Воеводин Вл.В., Жуматуй С.А., Соболев С.И., Антонов А.С., Брызгалов П.А., Никитенко Д.А., Стефанов К.С., Воеводин Вад.В.* // Практика суперкомпьютера "Ломоносов" // Открытые системы. М., 2012. N 7. P. 36.

Поступила в редакцию 08.12.2017

## MOLECULAR MODELING OF AN ALLOSTERIC INHIBITOR OPTACTIN'S BINDING IN THE NEW BINDING SITE IN NEURAMINIDASE A FROM STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Ya.A. Sharapova<sup>1</sup>, V.K. Švedas<sup>2\*</sup>

(*M.V. Lomonosov Moscow State University, <sup>1</sup>Faculty of Bioengineering and Bioinformatics; <sup>2</sup>Belozersky Institute of Physicochemical Biology; \*e-mail: vytyas@belozersky.msu.ru*)

Neuraminidase A (NanA) from the pathogenic bacteria *Streptococcus pneumoniae* catalyzes the cleavage of terminal sialic acid residues from oligosaccharide receptors on the surface of human respiratory epithelium cells and is considered as the key virulence factor. Search for new regulatory ligands' binding sites in the structure of this enzyme is of fundamental interest and can reveal new targets to design drugs for treatment of pneumonia, meningitis and other human infectious diseases. A low molecular weight compound optactin has been recently shown to inhibit the activity of the homologous Neuraminidase B (NanB). Furthermore, optactin binds at a separate site in the protein's structure, which is topologically different from the catalytic center. Bioinformatic and structure analysis using the pocketZebra method has been carried out to annotate the new, previously unknown site in the NanA's structure. This new site is analogous to the optactin binding site in NanB, and is characterized by a high content of the subfamily-specific positions, that indicate the importance of this site for the enzyme function. Molecular modeling has been used to study how the optactin binds in the allosteric sites of homologous neuraminidases NanA and NanB. Tyr250, Thr251, Lys334, Gln494, Lys499, Lys597, Thr657, Glu658 residues were shown to stabilize the optactin molecule in the NanB' structure, with water molecules playing an important role in the ligand coordination. Molecular modeling has shown that the optactin binding by the NanA is complicated due to substitutions in the subfamily-specific positions of the allosteric center. Peculiarities in the structural organization of the new NanA's binding site can help to design complementary ligands that can selectively regulate the activity of this enzyme.

**Key words:** allosteric site, bacterial neuraminidases from *Streptococcus pneumoniae*, NanA, NanB, optactin inhibitor, bioinformatic analysis, molecular modeling.

**Сведения об авторах:** Шарарова Яна Александровна – аспирант факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ (sharapova@belozersky.msu.ru); Шведас Витутас Юозас-Каятоно – профессор факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ, глав. науч. сотр. отдела биокинетики НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ, докт. хим. наук (vytyas@belozersky.msu.ru).