

ОЖЕРЄДОВ Д. С.✉, КАРПОВ П. А.

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НААН України»,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2А, ORCID: 0000-0003-3522-2714, 0000-0002-6876-642X

✉ ozheredovdaniil@ifbg.org.ua, (095)312-46-63

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ АЛОСТЕРИЧНИХ ЗСУВІВ СТРУКТУРИ FtsZ БІЛКІВ ПІД ВПЛИВОМ СПОЛУК БЕНЗАМІДНОЇ ПРИРОДИ І 4-ГІДРОКСИКУМАРИНІВ

Мета. Дослідження алостеричних перебудов молекул FtsZ, що виникають під впливом сполук бензамідної природи і похідних 4-гідроксикумаринів. Визначити ключові молекулярні механізми, що обумовлюють вплив зазначених сполук на апарат клітинного поділу бактерій. **Методи.** Порівняльний аналіз структур FtsZ білків та їхніх комплексів з лігандами. Залучення програмних інструментів структурної біоінформатики для візуалізації структур, вимірювання міжатомних дистанцій і оцінювання зсувів на підставі показників RMSD. **Результати.** Досліджено конформаційні зміни молекул FtsZ білка, що виникають внаслідок зв'язування алостеричних ефекторів: 4-гідроксикумарину – 4НС і бензаміду – 9РС (РС-190723). Досліджено алостеричні деформації та їхні наслідки на рівні молекули FtsZ білка, ГТФ-азного домену, спіралі Н7 і С-термінального домену. **Висновки.** Встановлено, що зв'язування бензамідів викликає значніші зміщення у структурі мономеру FtsZ білка, С-термінального домену і спіралі Н7, проте 4-гідроксикумарини майже вдвічі ефективніше деформує структуру ГТФ-азного домену. Обидва класи сполук реалізують алостеричну дію через унікальні механізми, що значною мірою реалізуються через деформації та зміщення спіралі Н7. Незважаючи на те, що зазначені сполуки мають різні алостеричні механізми дії й наслідки, їхній кінцевий ефект зводиться до порушень карману ГТФ, інтерфейсів протофіламенту і загальної геометрії молекули FtsZ білка.

Ключові слова: FtsZ, ефектори, бактерії, алостерична регуляція, структурні перебудови.

Розробка будь-яких ефекторів починається з визначення критичних процесів впливу, які регулюють життєдіяльність об'єкту та пошуку найкращих молекулярних мішеней [1, 2]. Отже, при розробці методів боротьби з бактеріальними захворюваннями першочергове значення мають

речовини, які здатні впливати на клітинний цикл бактерій [3]. Оскільки бінарний поділ є найбільш поширеним способом розмноження бактерій, значний інтерес при розробці антибіотиків приділяють ключовій молекулі апарату клітинного поділу, а саме, білка FtsZ (filamenting temperature-sensitive mutant Z) [3-5]. Бактеріальний гомолог тубуліну – FtsZ, бере безпосередню участь у формуванні дівісоми – мультибілкового комплексу, який відповідає за реалізацію процесу поділу бактеріальної клітини. Аналогічно тубуліну, полімеризація FtsZ у протофіламенти має ГТФ-фазну природу і вплив на геометрію карману гідролізу ГТФ [1]. У значній мірі це визначає не лише сам процес полімеризації, але також впливає на остаточну геометрію протофіламенту [6, 5]. Більшість існуючих інгібіторів FtsZ працюють за принципом «грубої сили» безпосередньо конкуруючи за сайт з молекулою ГТФ [1, 2]. Слабким місцем ГТФ-конкурентних інгібіторів є їх токсичність, яка саме і обумовлюється високою подібністю ГТФ-обмінних карманів у молекул FtsZ і тубуліну. Таким чином, дія таких речовин не лише пригнічує функціонування FtsZ бактерії, але й має небажаний вплив на систему мікротрубочок хазяїна. Проте, незважаючи на виразну структурну і функціональну гомологію FtsZ та ізотипів тубуліну їх амінокислотний склад має певні відмінності. Особливо це помітно за межами карману гідролізу ГТФ [7]. Це обумовлює зацікавленість до сполук, що мають альтернативні сайти зв'язування та діють за алостеричним механізмом [8, 9]. Як свідчать останні дослідження та дані RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org), на сьогоднішній день можна визначити два такі сайти. Перш за все, це сайт зв'язування бензамідних сполук і, по-друге, нещодавно визначений сайт зв'язування 4-гідроксикумаринів [8, 9]. Відомо, що в обох випадках, дія ефекторів цих сайтів реалізується через алостеричні здвиги, що деформують спіраль Н7, що у

© ОЖЕРЄДОВ Д. С., КАРПОВ П. А.

свою чергу впливає на структуру сайту ГТФ і контакти між субодинами. Це викликає аномальні викривлення загальної геометрії філаментів, що викликає критичні зміни у структурі z-кільця. Незважаючи на певну подібність алгоритмів реалізації впливу, сайти зв'язування бензамідних сполук та 4-гідроксикумаринів мають різну локалізацію, а, отже, зазначені структурні деформації будуть мати певні особливості. Саме дослідженню внутрішніх перебудов молекул FtsZ, і, зокрема, встановленню відмінностей деформацій зазначених елементів структури FtsZ білка присвячено актуальне дослідження. Ми сподіваємось, що розуміння цих перебудов допоможе оптимізувати подальший процес раціонального драгдизайну інгібіторів з алостеричним механізмом дії та дозволить повною мірою розкрити фармацевтичний потенціал зазначених сайтів.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були структури RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org) [10] бактеріального FtsZ з *Mycobacterium tuberculosis* Koch 5ZUE [11], 6Y1U і 6Y1V [9] у комплексі з 4-гідроксикумарином (4HC) та FtsZ з *Staphylococcus aureus* Rosenbach 5MN5 [12], 3VOB [8] і 4DXD [13] у комплексі з 3-[(6-хлоро[1,3]тіазоло[5,4-b]піридин-2-yl)метоксі]-2,6-дифлуробензамідом (9PC). Належність PDB-структур, до відповідного білка, а також, перевірка нумерації амінокислот, здійснювались на підставі їх відповідності депонуванням в базі UniProtKB (www.uniprot.org).

Візуалізацію та аналіз молекулярних структур виконували за допомогою програмного забезпечення PyMOL v.2.5.5 (Schrödinger LLC, www.pymol.org) та BIOVIA Discovery Studio 2021 Client (<https://discover.3ds.com/>). Подібність просторових структур, та оцінювання здвигів і деформацій елементів вторинної структури здійснювалось на підставі показників RMSD Ca-атомів і інструментів програми PyMOL.

Результати та обговорення

Відомо декілька сайтів взаємодії з низькомолекулярними сполуками, які інгібують ГТФ-азну активність і полімеризацію мономерів FtsZ білка у протофіламенти [1, 2]. Крім безпосередньо сайту гідролізу ГТФ, це алостеричні сайти зв'язування 4-гідроксикумарину (PDB: 4HC), що знаходиться у N-термінальному (ГТФ-азному) домені [9] та зв'язування бензамідів (на приклад,

PC190723 = PDB: 9PC), що розташовано у міждоменній щілині між C-термінальним доменом та H7 спіраллю [14]. Останні дослідження свідчать про те, що структурні зміни геометрії протофіламентів FtsZ білка значною мірою залежать від форми і жорсткості спіралі H7. Було висунуто припущення, що саме зміни у домені спіралі H7 дозволяють FtsZ переходити у різний конформаційний стан. На підставі аналізу структур з RCSB Protein Data Bank була запропонована модель конформаційних змін, що відбуваються під час полімеризації/деполімеризації FtsZ. Зазначена модель передбачає існування таких нативних конформаційних станів, як вигнутий філамент, де FtsZ зв'язано з GTP та прямий філамент, де FtsZ зв'язано з GDP [8, 15]. З появою x-Ray структур, стало зрозумілим, що зазначені алостеричні інгібітори мають відмінні сайти зв'язування, але так чи інакше, їх дія реалізується через деформації H7 спіралі, які алостерично, впливають на сайт GTP і змінюють геометрію контактів FtsZ у протофіламенті. З позиції раціонального драгдизайну і віртуального скринінгу, принциповим питанням є розуміння нюансів геометрії і динаміки цих перебудов. Ми впевнені, що різне розташування зазначених сайтів вказує на те, що такі відмінності мають бути. Наше дослідження мало за мету дослідити зазначені перебудови на підставі структурних даних представлених у RCSB Protein Data Bank.

Перш за все, нами було виконано порівняння загальних конформаційних змін молекул *MtFtsZ* та *SaFtsZ* під впливом їх взаємодії з ефекторами. Аналіз здійснювався із використанням структур 5ZUE (вільний *MtFtsZ*), 6Y1U та 6Y1V (комплекс *MtFtsZ* з 4HC), 5MN5 (вільний *SaFtsZ*), 4DXD та 3VOB (комплекс *SaFtsZ* з 9PC). Отримані результати свідчать про те, що під впливом алостеричних ефекторів обох сайтів, просторова структура мономерів FtsZ зазнає помітних змін, про що свідчать показники RMSD (рис. 1). Так, для *MtFtsZ* (приклад зв'язування 4-гідроксикумарину) показник загального RMSD структур склав 0,91, а для *SaFtsZ* (приклад зв'язування PC190723) – 1,79. Також було встановлено, що для різних сайтів, зв'язування лігандів викликає відмінні зміщення окремих структур, елементів вторинної структури і доменів молекули FtsZ. Так, для *MtFtsZ* показник RMSD по ГТФ-азному домену склав 0,69. У той час як для *SaFtsZ* цей показник складав лише 0,37. Це свідчить проте, що вплив зв'язування похідних кумаринів для цього домену є більш критичними.

Аналогічне вирівнювання просторових структур С-термінальних доменів показало, що RMSD для *MtFtsZ* складає лише 0,46, у той час, як для *SaFtsZ* воно дорівнює 0,71. Таким чином, для С-кінцевого домену, наслідки від зв'язування бензамідних похідних, є більш суттєвими. При цьому, отримані дані підтверджують те, що найбільш значних конформаційних змін зазнають саме ті структурні ділянки *FtsZ* білка, які безпосередньо беруть участь у зв'язуванні лігандів.

Як було згадано раніше, очевидну ліганд-залежну деформацію геометрії спіралі Н7 було засвідчено при взаємодії із обома класами зазначених сполук [9, 14]. Більш того, саме з алостеричними деформаціями спіралі Н7 зв'язують зміни карману ГТФ та деформації внутрішніх інтерфейсів протофіламентів [8, 9]. Тому був проведений аналіз конформаційної мінливості спіралі Н7, яка знаходиться у міждоменному положенні та є своєрідною армувальною структурою, від якої залежить конформаційний стан мономеру *FtsZ* і геометрія протофіламенту. Отримані результати свідчать про те, що утворення комплексу *SaFtsZ* з 9PC супроводжується значними деформаціями спіралі Н7 (показник RMSD на рівні 1,6). Це добре співвідноситься з попередніми результатами, які вказують на те, що зв'язування лігандів у сайті міждоменної щілини, яку утворюють Н7-спіраль та С-кінцевий домен (сайт

зв'язування бензамідів), впливає не лише на конформацію домена, а й вигинання спіралі Н7. Проте, досить неочікуваним була деформація спіралі Н7 у мономера *MtFtsZ* зв'язаного з 4HC, де відхилення від контролю за показником RMSD склало 1,1. З огляду на те, що сайт зв'язування гідроксикумаринів безпосередньо не контактує з спіраллю Н7 та знаходиться на досить значній відстані, таке зміщення свідчить про виникнення між ними каскаду алостеричних зсувів.

Вирівнювання просторових структур *MtFtsZ* та *SaFtsZ* за ГТФ-азним доменом (а. к. залишки 11-169) (Рис. 2, 3) показали, що деформації Н7 спіралі впливають на структуру ГТФ-азного домену. Було встановлено, що зв'язування лігандів у бензамідному та кумариновому сайтах обумовлюють зміщення Н7 спіралі в напрямку С-термінального домену змінюючи її нахил та, як наслідок, переорієнтацію петлі Н6-Н7 (Рис. 2 Б), що може впливати на можливість утворення латеральних контактів. Зсув Н7 спіралі в розглянутих нами випадках відбувається не однаково (Рис. 2 В, 3). Так, зв'язування бензамідів (9PC) супроводжується зміщенням спіралі Н7 у бік поверхні мономеру по всій її довжині. При цьому спостерігається також зміщення її в бік петлі Т7 приблизно на 1 крок спіралі (Рис. 3 Б). Це добре співвідноситься з даними Такаши Матсуї та ін., які були отримані на прикладі комплексів *SaFtsZ* з ГТФ та 9PC [14].

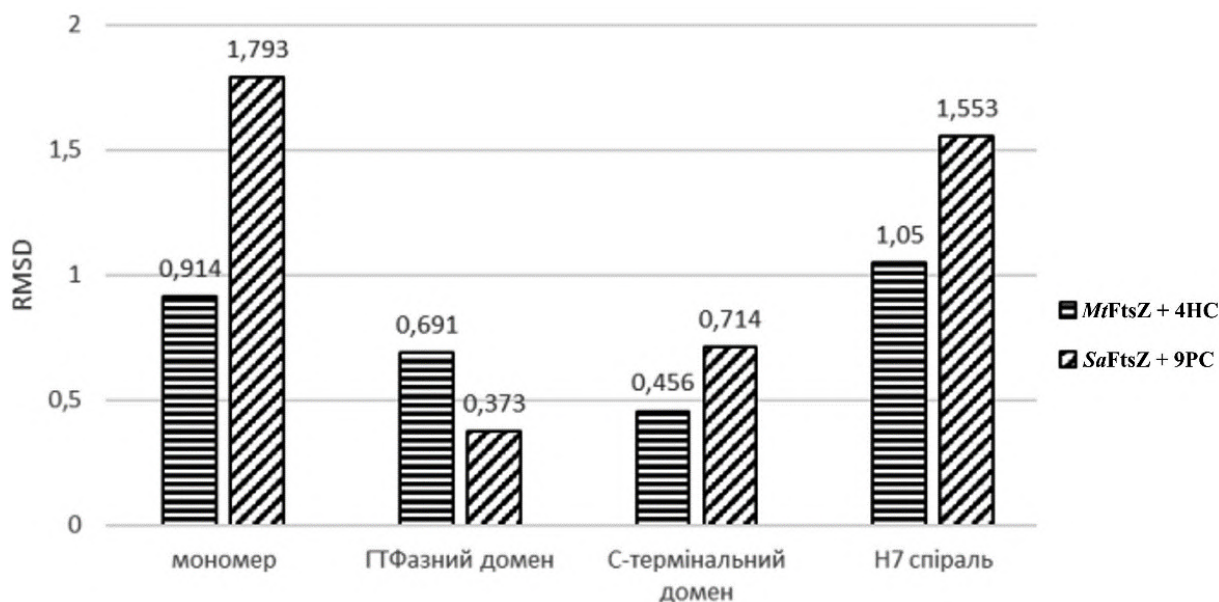


Рис. 1. Відмінності (RMSD) структур *MtFtsZ* та *SaFtsZ*, які виникають як наслідок їх взаємодії з алостеричними ефекторами гідроксикумаринової і бензамідної природи. Встановлено, що зв'язування бензамідів викликає більш значні зміщення у структурі мономеру, С-термінального домену і спіралі Н7, проте 4-гідроксикумарини майже вдвічі ефективніше деформують структуру ГТФ-азного домену.

Зв'язування похідних кумарину (4HC) відбувається в ГТФ-азному домені та не має безпосереднього впливу на конформаційний стан спіралі H7 (Рис. 2 А). Проте, відбувається алостерична деформація спіралі H7. Зсув спіралі спрямований в сторону С-термінального домена та вглиб глобули FtsZ білка (Рис. 2 Б, В). Цей зсув є більш вираженим ніж у випадку 9PC. Так, для *Sa*FtsZ при утворенні комплексу з 9PC (3VOB) величина зсуву спіралі H7 дорівнювала 4,2 Å на початку спіралі, а для комплексу 6Y1V, а у випадку комплексу з 4-гідроксикумарином

(*Mt*FtsZ+4HC) зсув між С α -атомами початку H7 спіралі складав 6,8 Å (Рис. 2 В). Також в комплексах 6Y1V та 6Y1U спостерігали нерівномірний зсув H7 спіралі, що обумовило її вигін. При цьому, суттєва деформація відбувалася на ділянці з 175 по 189 а. к. залишки при загальній довжині спіралі з 175 по 200 а. к. залишки. Діапазон зсуву між відповідними С α -атомами знаходився в межах від 7,5 до 0,3 Å, зменшуючись по довжині H7 (рис. 3).

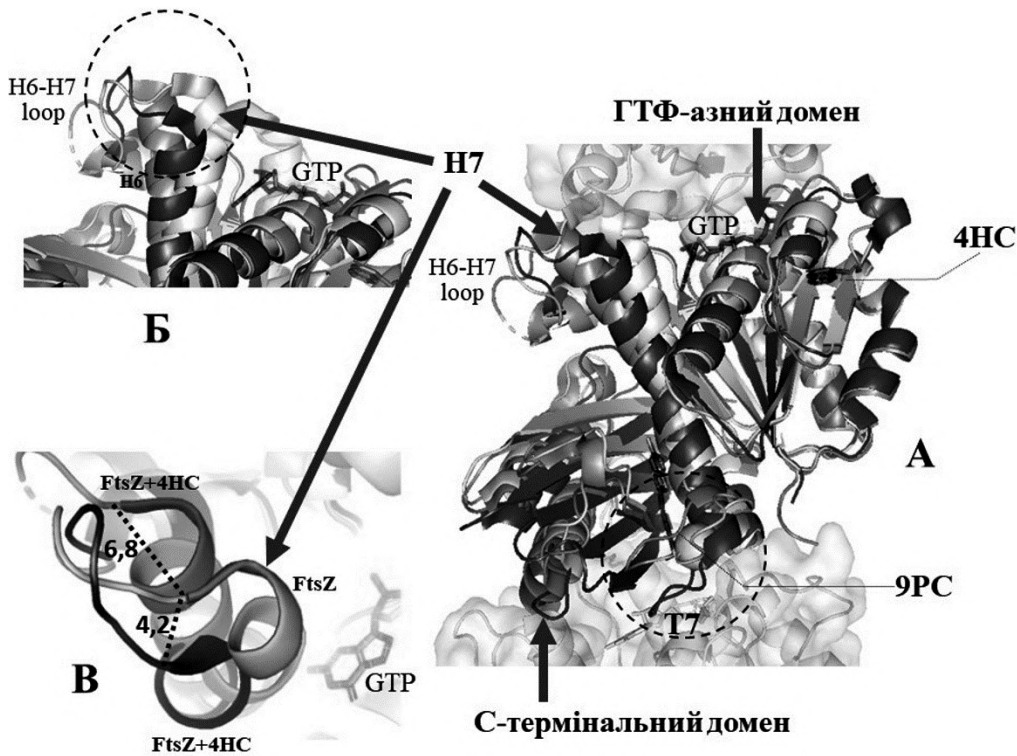


Рис. 2. Структурне вирівнювання просторових структур FtsZ *Mycobacterium tuberculosis* і *Staphylococcus aureus* депонованих в RCSB Protein Data Bank: 5ZUE (*Mt*FtsZ + ГТФ), 6Y1V (*Mt*FtsZ + 4HC) та 3VOB (*Sa*FtsZ + 9PC). А) Мономери з зазначенням потенційних дистальних контактів між ними (структурне накладання мономерів на модель протофіламенту); Б) латеральна проекція спіралі H7; В) спіралі H7 – проекція з боку петлі H6-H7 (H6-H7 loop).

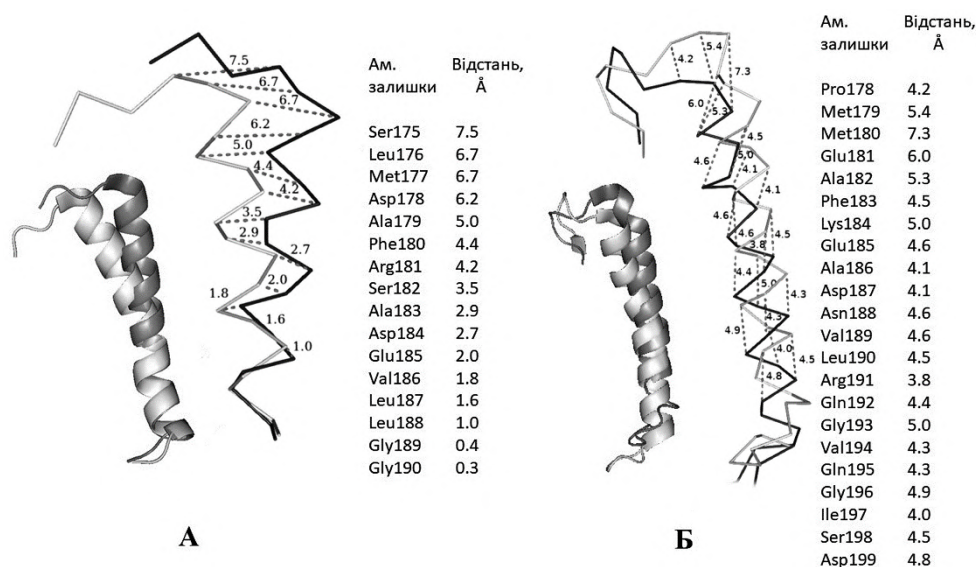


Рис. 3. Результати вимірів відстаней між Ca атомами спіралі Н7 FtsZ білка у вільному стані та комплексу з інгібітором (4HC або 9PC). **А**) MtFtsZ та MtFtsZ + 4HC Н7-спіралі (а. к. залишки 175-200); **Б**) SaFtsZ та SaFtsZ + 9PC Н7-спіралі (а. к. залишки 178-199).

Висновки

Досліджені конформаційні зміни молекули FtsZ як наслідок впливу алостеричних ефекторів, які відрізняються за хімічним класом і сайтами зв'язування. Незважаючи на те, що значною мірою дія бензамідних сполук та 4-гідроксикумаринів реалізується через здвиги спіралі Н7, їх механізми і наслідки для молекул FtsZ мають принципові відмінності. Показано, що на рівні окремої молекули FtsZ перебудови під впливом бензамідних сполук мають глобальніший характер, ніж у випадку з 4-гідроксикумаринами. Проте, алостеричні зсуви у ГТФ-азному домені майже вдвічі більші у випадку взаємодії саме з 4-гідроксикумарином, що значною мірою обумовлює механізм дії даного класу сполук. Інші перебудови, які виникають у молекулі FtsZ під впливом обох класів сполук, значною мірою залежать від деформацій і зміщень спіралі Н7. При цьому, 4-гідроксикумарини обумовлюють деформацію

(ізлом) спіралі Н7 із зміщенням її частини, розташованої ближче до сайту зв'язування ГТФ. При зв'язуванні бензамідних сполук, явних деформацій спіралі Н7 не спостерігається, але відбувається зміщення всієї спіралі, що обумовлює зсув петлі Т7 та має негативні наслідки для об'єму сайту зв'язування ГТФ, а також опосередковано впливає на ГТФ-азну активність та процеси полімеризації протофіламенту. Таким чином, механізм дії обох класів сполук пов'язаний з опосередкованим пригнічення ГТФ-азної активності FtsZ, а також деформацією контактних поверхонь протофіламенту. При цьому, як перший, так і другий клас сполук реалізують алостеричну дію через унікальні механізми, що значною мірою реалізуються через деформації та зміщення спіралі Н7.

Дослідження виконано в рамках фундаментальних досліджень Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України., Національної акад. наук. України: № 0120U100937 – Біоінформаційні та молекулярно-клітинні дослідження будови та функцій цитоскелету рослин.

References

1. Karpov P. A., Demchuk O. M., Britsun V. M., Lytvyn D. I., Pydiura M. O., Rayevsky O. V., Samofalova D. O., Spivak S. I., Volochnyuk D. M., Yemetes A. I., Blume Ya. B. New imidazole inhibitors of *Mycobacterial* FtsZ: the way from high-throughput molecular screening in Grid up to *in vitro* Verification. *Science and Innovation (Nauka innov.)*. 2016. Vol. 12 (3). P. 44–59. doi: 10.15407/scin12.03.044.
2. Ozhieredov D. S., Karpov P. A. Structural profile of ligand-based inhibition of bacterial FtsZ. *Faktori eksperimental noi evolucii organizmiv*. 2023. Vol.3 2. P. 142–147. DOI: 10.7124/FEEO.v32.1551.
3. Casiraghi A., Suigo L., Valoti E., Straniero V. Targeting Bacterial Cell Division: A Binding Site-Centered Approach to the Most Promising Inhibitors of the Essential Protein FtsZ. *Antibiotics (Basel)*. 2020. Vol. 9 (2). P. 69. doi: 10.3390/antibiotics9020069.
4. Adams D. W., Errington J. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol*. 2009. Vol. 7 (9). P. 642–653. doi: 10.1038/nrmicro2198.

5. Haeusser D. P., Margolin W. Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial *Z ring*. *Nat Rev Microbiol*. 2016. Vol. 14 (5). P. 305–319. doi: 10.1038/nrmicro.2016.26.
6. Erickson H. P., Anderson D. E., Osawa M. FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010. Vol. 74 (4). P. 504–528. doi: 10.1128/MMBR.00021-10.
7. Faguy D. M., Doolittle W. F. Cytoskeletal proteins: the evolution of cell division. *Curr Biol*. 1998. Vol. 8 (10). R338-341. doi: 10.1016/s0960-9822(98)70216-7.
8. Matsui T., Han X., Yu J., Yao M., Tanaka I. Structural change in FtsZ Induced by intermolecular interactions between bound GTP and the T7 loop. *J Biol Chem*. 2014. Vol. 289 (6). P. 3501–3509. doi: 10.1074/jbc.M113.514901.
9. Alnami A., Norton R. S., Pena H. P., Haider S., Kozielski F. Conformational Flexibility of A Highly Conserved Helix Controls Cryptic Pocket Formation in FtsZ. *J Mol Biol*. 2021. Vol. 433 (15). P. 167061. doi: 10.1016/j.jmb.2021.167061.
10. Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 2000. Vol. 28 (1). P. 235–242. doi: 10.1093/nar/28.1.235.
11. Guan F., Yu J., Yu J., Liu Y., Li Y., Feng X.H., Huang K.C., Chang Z., Ye S. Lateral interactions between protofilaments of the bacterial tubulin homolog FtsZ are essential for cell division. *Elife*. 2018. Vol. 7. e35578. doi: 10.7554/eLife.35578.
12. Wagstaff J. M., Tsim M., Oliva M. A., García-Sánchez A., Kureisaite-Ciziene D., Andreu J. M., Löwe J. A Polymerization-Associated Structural Switch in FtsZ That Enables Treadmilling of Model Filaments. *mBio*. 2017. Vol. 8 (3). e00254-17. doi: 10.1128/mBio.00254-17.
13. Tan C. M., Therien A. G., Lu J., Lee S. H., Caron A., Gill C. J., Lebeau-Jacob C., Benton-Perdomo L., Monteiro J.M., Pereira P.M., et al. Restoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility to β -lactam antibiotics. *Sci Transl Med*. 2012. Vol. 4 (126). 126ra35. doi: 10.1126/scitranslmed.3003592.
14. Matsui T., Yamane J., Mogi N., Yamaguchi H., Takemoto H., Yao M., Tanaka I. Structural reorganization of the bacterial cell-division protein FtsZ from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2012. Vol. 68 (Pt 9). P. 1175–1188. doi: 10.1107/S0907444912022640.
15. Martín-Galiano A. J., Buey R. M., Cabezas M., Andreu J. M. Mapping flexibility and the assembly switch of cell division protein FtsZ by computational and mutational approaches. *J Biol Chem*. 2010. Vol. 285 (29). P. 22554–22565. doi: 10.1074/jbc.M110.117127.

OZHEREDOV D. S., KARPOV P. A.

Institute of Food Biotechnology and Genomics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Baida-Vyshnevetsky str., 2A

COMPARATIVE ANALYSIS OF ALLOSTERIC REARRANGEMENTS IN FtsZ PROTEIN STRUCTURE, INDUCED BY BENZAMIDE AND 4-HYDROXYCOUMARINE COMPOUNDS

Aim. To reveal allosteric rearrangements of FtsZ molecules arising under the influence of benzamide compounds and 4-hydroxycoumarin derivatives. To discover the key molecular mechanisms predetermining the effect of the specified compounds on the cell division in bacteria. **Methods.** Comparative analysis of FtsZ protein structures and their complexes with ligands. Application of structural bioinformatics software for molecular visualization, measurement of interatomic distances and approximation of intramolecular shifts based on RMSD indicators. **Results.** Revealed conformational changes in FtsZ protein molecules, induced by allosteric effectors: 4-hydroxycoumarin – 4HC and benzamide – 9PC (PC-190723). Allosteric deformations and their consequences for intact FtsZ protein molecules, their GTPase domains, H7 helixes and C-terminal domains were studied. **Conclusions.** It was clarified that the binding of benzamides causes more significant shifts in the structure of the FtsZ protein monomer, its C-terminal domain, and H7 helix. At the same time, 4-hydroxycoumarins deform the structure of the GTPase domain almost twofold effectively. Both classes of compounds possess allosteric action through unique mechanisms that are largely realized through deformations and displacements of the H7 helix. Despite the fact that these compounds demonstrate different allosteric mechanisms of action, their final effect can be summarized to distortions in GTP pocket, protofilament interfaces and the general geometry of molecule. **Keywords:** FtsZ, effectors, bacteria, allosteric regulation, structural rearrangements.