

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**Шарапова Яна Александровна**

**Поиск новых путей регуляции функциональных свойств  
нейраминидазы NanA как ключевого фермента патогенеза  
*Streptococcus pneumoniae* с использованием методов компьютерной  
биологии**

Специальность 03.01.08 – Биоинженерия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена на факультете биоинженерии и биоинформатики и в НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

- Научный руководитель** – *Швядас Витаутас Юозапас-Каятоно,*  
доктор химических наук, профессор Факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова
- Официальные оппоненты** – *Шайтан Константин Вольдемарович,*  
доктор физико-математических наук, профессор кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова  
*Синицын Аркадий Пантелеймонович,*  
доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией на кафедре химической энзимологии Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова  
*Щербинин Дмитрий Сергеевич,*  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института трансляционной медицины РНИМУ имени Н.И. Пирогова

Защита диссертации состоится 15 сентября 2021 года в 16:30 на заседании диссертационного совета МГУ.03.04 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.

E-mail: [dissovet@belozersky.msu.ru](mailto:dissovet@belozersky.msu.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/384510163/>

Автореферат разослан «\_\_\_» августа 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук

Шаповалова И.В.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

NanA, NanB, NanC – нейраминидазы A, B и C из *Streptococcus pneumoniae*; МД – молекулярная динамика / молекулярно-динамический; а.о. – аминокислотный остаток; CAZy – Carbohydrate-Active enZYmes; GH – Glycoside Hydrolase – гликозилгидролазы; PDB – Protein Data Bank; CBM – углевод-связывающий модуль; BgaA –  $\beta$ -галактозидаза A из *S. pneumoniae*; APBS – Adaptive Poisson-Boltzmann Solver; IC<sub>50</sub> – концентрация ингибитора, уменьшающая активность фермента на 50%.

## ВВЕДЕНИЕ

### 1. Актуальность темы исследования

Среди трех нейраминидаз (NanA, NanB и NanC), продуцируемых пневмококком (*Streptococcus pneumoniae*), наибольшее внимание привлекает нейраминидаза A (NanA) – один из ключевых белков в патогенезе. Попав в носоглотку человека, эта болезнетворная бактерия прикрепляется к эпителию и образует биопленку, становясь постоянным, трудноискоренимым очагом инфекции и воспаления. Из носоглотки бактерия может распространяться в другие части организма, вызывая пневмонию, отит и менингит. Многочисленные исследования показали, что нейраминидаза A необходима пневмококку для колонизации: отрезая сиаловую кислоту от олигосахаридных рецепторов на поверхности эпителия, NanA способствует бактериальной адгезии, питанию и росту бактерий, а также образованию биопленки. Нейраминидаза A пневмококка является гомологом активно изучаемой нейраминидазы вируса гриппа. Известно, что совместное инфицирование человека вирусом гриппа и пневмококком может привести к опасным осложнениям. По этим причинам нейраминидазы обоих патогенов считаются перспективными мишенями для действия лекарств.

### 2. Степень разработанности темы исследования

Несмотря на важность NanA в жизнедеятельности бактерии, этот фермент еще мало изучен: не расшифрована полная кристаллографическая структура, не известно ни одного функционального/регуляторного участка связывания помимо каталитического центра (хотя недавние исследования предполагают наличие аллостерических центров в практически любых белках), неясны механизмы участия NanA в формировании биопленки. Недостаточное понимание структурной организации и функциональных особенностей действия

NanA затрудняет возможность использования этого фермента в качестве мишени для разработки антибактериальных препаратов.

### **3. Цель и задачи исследования**

Целью настоящего исследования являлся поиск новых путей регуляции функциональных свойств нейраминидазы NanA как ключевого фермента в патогенезе *Streptococcus pneumoniae*. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Провести сравнительный биоинформатический анализ информации о последовательностях и структурах родственных нейраминидаз/сиалидаз для выявления общих черт структурной организации, закономерностей функционирования и регуляции эволюционно удаленных гомологов из различных бактерий и вирусов;
2. С использованием биоинформатического анализа и молекулярного моделирования изучить особенности организации участков связывания лигандов в структуре NanA и охарактеризовать неизвестные ранее функциональные сайты;
3. С использованием молекулярного моделирования изучить механизмы ингибирования NanA при связывании низкомолекулярных лигандов в активном центре и иных топологически независимых от него участках в структуре фермента.

### **4. Научная новизна**

Впервые проведено детальное исследование особенностей структурной организации NanA из *Streptococcus pneumoniae* на основании сравнения с известными структурами гомологичных сиалидаз и комплексного моделирования. Установлено, что, в отличие от других сиалидаз, домены в молекуле NanA не вступают в образование цельной структуры, что в купе с наличием неупорядоченных участков структуры придает этому модульному ферменту гибкость и подвижность. Впервые показано, что, благодаря гибкости структуры NanA, две молекулы фермента способны образовать стабильный межмолекулярный комплекс. Поскольку каждая молекула NanA прикреплена к поверхности бактерии длинным гибким участком полипептидной цепи, агрегация молекул NanA, находящихся на соседних бактериальных клетках, способна связывать их в сеть, что может являться одним из механизмов участия NanA в формировании биопленки. В структуре NanA описаны два новых, неизвестных ранее аллостерических центра, охарактеризовано их строение и

возможность использования для функциональной регуляции NanA. Один из них расположен в интерфейсе взаимодействия двух молекул NanA; связывание в этом аллостерическом центре артокарпина – экспериментально подтвержденного ингибитора каталитической функции и образования биопленок, препятствует образованию устойчивого межмолекулярного агрегата. Другой аллостерический центр расположен с противоположной стороны от активного центра, способен связывать сахара, входящие в состав олигосахаридных рецепторов и, возможно, способствует бактериальной адгезии. Выявлены различия в структурной организации участков связывания ингибиторов бактериальных и вирусных нейраминидаз, которые необходимо учитывать при создании ингибиторов двойного действия.

## **5. Теоретическая и практическая значимость**

Изучение структурно-функциональных взаимосвязей в NanA и поиск новых путей ее регуляции представляет фундаментальный и практический интерес. В данной работе с помощью методов компьютерной биологии показано, что в отличие от большинства гомологичных сиалидаз, NanA из *S. pneumoniae* обладает уникальной гибкой, подвижной организацией, что, помимо лучшего понимания ее структуры и роли в патогенезе, открывает новые практические возможности для дизайна препаратов, нацеленных на ингибирование адгезии бактерий к эпителию и образования ими биопленки.

## **6. Методология и методы исследования**

В работе использован комплекс современных методов биоинформатики и молекулярного моделирования, в том числе молекулярная динамика, докинг белок-белок и белок-лиганд, моделирование полноразмерной структуры белка по гомологии, а также сравнительный анализ структур и аминокислотных последовательностей. Важным методологическим аспектом в работе являлось использование ресурсов суперкомпьютера «Ломоносов-2». Для разных типов задач подбиралась конкретная конфигурация вычислительного оборудования, доступного на разных узлах и разделах суперкомпьютера с целью оптимизации эффективности расчета.

Все последовательности и структуры нейраминидаз брали из публичных баз данных, таких как PDB, UniProt, SwissProt, TrEMBL. Модифицированную версию PDB2PQR v. 1.9.0, совместимую с PROPKA v. 3.1, использовали для протонирования моделей ферментов. Пакет AmberTools использовали для параметризации систем в силовом поле FF15IPQ (дополнительную серию

вычислений проводили также в силовом поле FF14SB и другом растворителе для исключения влияния выбора параметров моделирования на результат). Модели ферментов помещали в ячейку с растворителем так, чтобы расстояние от любого атома белка до края периодической ячейки было не менее 12 Å (а в некоторых случаях 30 Å). Для молекулярной динамики использовали многоступенчатый протокол, описанный в полном тексте диссертации.

Докинг лигандов в белок проводили в программе LeadFinder. При поиске сайтов их связывания использовали большие ансамбли конформеров белка, полученные из длительных молекулярно-динамических симуляций. Белок-белковый докинг проводили с использованием веб-серверов ClusPro и ZDOCK (для исключения влияния выбора программы на результат); для него также использовали ансамбли конформеров.

Построение множественных структурно-опосредованных выравниваний гомологов проводили при помощи веб-сервера Mustguseal, который объединяет и автоматизирует классические методы биоинформатики, такие как BLAST, MAFFT, и др. Анализ полученных выравниваний осуществляли с использованием веб-сервера Zebra2 для поиска консервативных и специфических позиций.

## **7. Положения, выносимые на защиту**

- 1) NanA из *S. pneumoniae* характеризуется гибкой структурной организацией благодаря соединению каталитического и лектинового доменов подвижным линкером из 16 аминокислотных остатков;
- 2) Молекулы NanA, прикрепленные к поверхности разных клеток пневмококка, способны образовать агрегаты за счет межмолекулярного взаимодействия лектиновых и каталитических доменов, что может являться одним из механизмов образования биопленок пневмококком;
- 3) В структуре NanA охарактеризованы два новых, неизвестных ранее аллостерических центра, расположенные в интерфейсе взаимодействия двух молекул NanA при межмолекулярной агрегации и в воронке шестилопастного β-пропеллера на противоположной стороне от активного центра;
- 4) Определены различия в структурной организации активных центров в NanA из патогенной бактерии *S. pneumoniae* и вирусных нейраминидазах, идентифицированы консервативные позиции, а также специфические остатки, отличающиеся у нейраминидаз из различных источников и обуславливающие селективность каждого центра. Полученные результаты

создают основу для дизайна ингибиторов двойного действия, способных подавлять активность как бактериальных, так и вирусных нейраминидаз.

## **8. Степень достоверности**

Результаты диссертационного исследования получены с помощью современных методов молекулярного моделирования и биоинформатического анализа. Вычислительные эксперименты проводились в несколько повторений с соответствующими контрольными экспериментами и хорошо воспроизводились. Дополнительные серии вычислений проводили в другом силовом поле и растворителе, а также с использованием другой программы для исключения влияния выбора параметров моделирования на результат. При поиске сайтов связывания лигандов использовали большие ансамбли конформеров белка, полученные из длительных молекулярно-динамических симуляций. Результаты, полученные в данной работе, согласуются с экспериментальными данными из публикаций других исследовательских групп. Литературный обзор и обсуждение результатов подготовлены с использованием всей доступной литературы по теме. Результаты диссертационного исследования опубликованы в рецензируемых научных журналах.

## **9. Личный вклад автора в проведение исследования**

Личный вклад соискателя заключался в анализе литературных источников, планировании и проведении вычислительных экспериментов, анализе и интерпретации полученных результатов, подготовке научных публикаций, представлении результатов на конференциях. Основные результаты работы получены самим автором.

## **10. Публикации по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликованы 4 статьи в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, индексируемых в наукометрических базах данных Web of Science и/или Scopus.

## **11. Апробация работы**

Часть материалов диссертации защищена в 2019 году в рамках НКР (научно-квалификационной работы), подготовленной во время обучения в аспирантуре факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М. В. Ломоносова. Результаты диссертационного исследования были представлены на следующих

конференциях: International Symposium «Systems Biology and Bioinformatics» (Санкт-Петербург, Россия, 2016), Moscow Conference on Computational Molecular Biology (МССМВ'17 и МССМВ'19, Москва, Россия, 2017 и 2019 гг.), Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018», «Ломоносов-2019» и «Ломоносов-2020» (Москва, Россия, 2018, 2019 и 2020 гг.), Russian Supercomputing Days (Москва, Россия, 2019), The 44th FEBS Congress (Краков, Польша, 2019).

## 12. Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, методы, результаты и их обсуждение, заключение, основные результаты и выводы, список литературы. Работа изложена на 160 страницах, содержит 44 иллюстрации и цитирует 261 литературный источник.

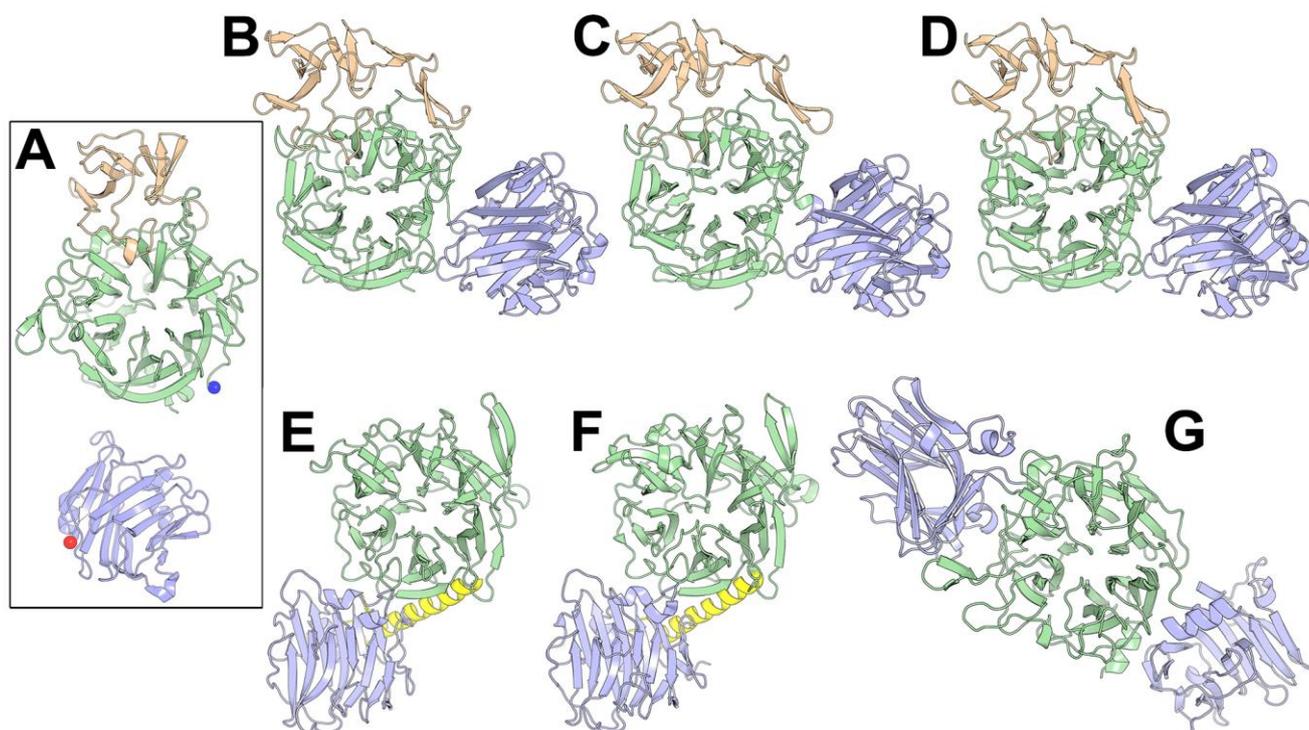
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Подавление функциональных свойств нейраминидазы NanA ингибиторами межмолекулярной агрегации

#### Изучение уникальной структурной организации NanA из *S. pneumoniae*

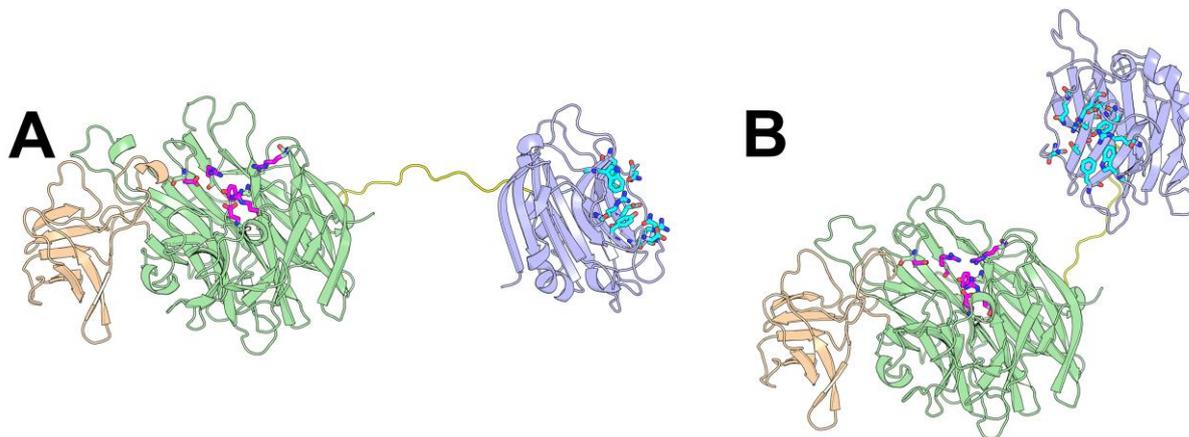
Лектиновый и каталитический домены NanA, NanB и NanC из *S. pneumoniae* относятся к семействам CBM40 и GH33 классификации CAZy, соответственно. Однако NanB и NanC представлены в PDB жесткими, компактными глобулами, в то время как попытки получить полную структуру NanA не увенчались успехом, и в PDB этот фермент представлен отдельными записями для лектинового и каталитического (включая вставку инсерционного) доменов. Для построения полноразмерной структуры NanA было проведено сравнение со всеми известными гомологами, в которых домены CBM40 и GH33 являются частью структуры единой глобулы: NanB и NanC из *S. pneumoniae* (две другие нейраминидазы, экспрессируемые пневмококком), транс-сиалидазой из *Macrobacteria decora*, сиалидазами из *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi* и *Vibrio cholerae* (рис. 1), и изучение стабильности этих структур. В течение 500 нс МД-симуляций структуры гомологов оставались плотно упакованными в жесткие, стабильные глобулы. Междоменные контакты во всех ферментах были представлены плотной сетью стабилизирующих взаимодействий: например, 6

водородных связей и 3 солевых мостика формировались между 16 аминокислотными остатками в лектиновом и каталитическом доменах NanB; 7 водородных связей и 3 солевых мостика образовывались между 18 аминокислотными остатками доменов в NanC. Карты поверхностей электростатического потенциала, рассчитанные с использованием подхода APBS, показали, что комплементарные области поверхностей контакта лектинового и каталитического доменов в гомологах NanA в основном противоположно заряжены на периферии, а остатки ближе к центру интерфейса гидрофобные. Соответствующие трехмерные структуры использовали в качестве образцов при молекулярном моделировании NanA по гомологии. Чтобы учесть все возможные ориентации лектинового домена относительно каталитического (вместе с инсерционным доменом здесь и далее) использовали белок-белковый докинг. Молекулярное моделирование с использованием длительных МД-симуляций показало, что лектиновый и каталитический домены NanA, соединенные междоменным линкером, не способны образовать компактную структуру. Расчеты APBS также свидетельствуют о недостаточной электростатической комплементарности потенциальных поверхностей контакта доменов во всех изученных моделях NanA. Действительно, биоинформатический анализ показал, что аминокислотные остатки, которые образуют стабилизирующие междоменные взаимодействия в других ферментах (например, NanB и NanC), в NanA либо замещены аминокислотами с другими физико-химическими свойствами, либо соответствующие участки структуры имеют другую организацию. Таким образом было установлено, что лектиновый и каталитический домены NanA отделены в пространстве гибким междоменным линкером длиной в 16 а.о. (рис. 2). Подобная структурная организация ферментов, состоящих из нескольких компактных доменов, соединенных гибкими линкерами, является редкой, однако встречается в природе среди белков, которым конформационная гибкость необходима для выполнения какой-либо функции. Например, многие белки, участвующие в деградации клеточной стенки растений, представляют собой модульные ферменты, состоящие из каталитического домена, присоединенного гибким линкером к углевод-связывающему модулю (СВМ).



**Рисунок 1.** PDB структуры отдельных доменов NanA из *S. pneumoniae*, а также полноразмерных гомологичных нейраминидаз/сиалидаз, которые имеют каталитические и лектиновые домены, гомологичные доменам NanA и входящие в состав компактной глобулы. (A) Каталитический домен, включая инсерционный домен, (2YA8) и лектиновый домен (4ZXK) NanA из *S. pneumoniae*; (B) NanB из *S. pneumoniae* (2JKB); (C) NanC из *S. pneumoniae* (4YW2); (D) транс-сиалидаза из *M. decora* (2SLI); (E) сиалидаза из *T. rangeli* (1MZ6); (F) сиалидаза из *T. cruzi* (3PJQ); (G) сиалидаза из *V. cholerae* (1W0O). Лектиновый домен выделен голубым цветом, каталитический домен – зеленым, с инсерционным доменом (там, где он есть), выделенным бежевым. Междоменный линкер выделен желтым (там, где он есть). На изображении (A)  $\alpha$ -атомы последнего а.о. в лектиновом домене (красный) и первого а.о. в каталитическом домене (синий) NanA показаны в виде сфер.

Наличие СВМ позволяет повысить эффективность биокаталитического гидролиза целлюлозы за счет эффективного связывания целлюлаз на поверхности субстрата. Известно, что лектиновый домен играет важную роль в функционировании бактериальных нейраминидаз. Подобно СВМ в целлюлазах, лектиновый домен в нейраминидазах может способствовать локализации фермента на стенках дыхательных путей, богатых сиаловой кислотой, приблизив, таким образом, каталитический домен к субстрату. Присутствие лектинового домена в структурах бактериальных нейраминидаз значительно повышает их каталитическую эффективность по отношению к поливалентным сиалозидам за счет взаимодействия с разными остатками сиаловой кислоты в составе разветвленных полисахаридных субстратов.



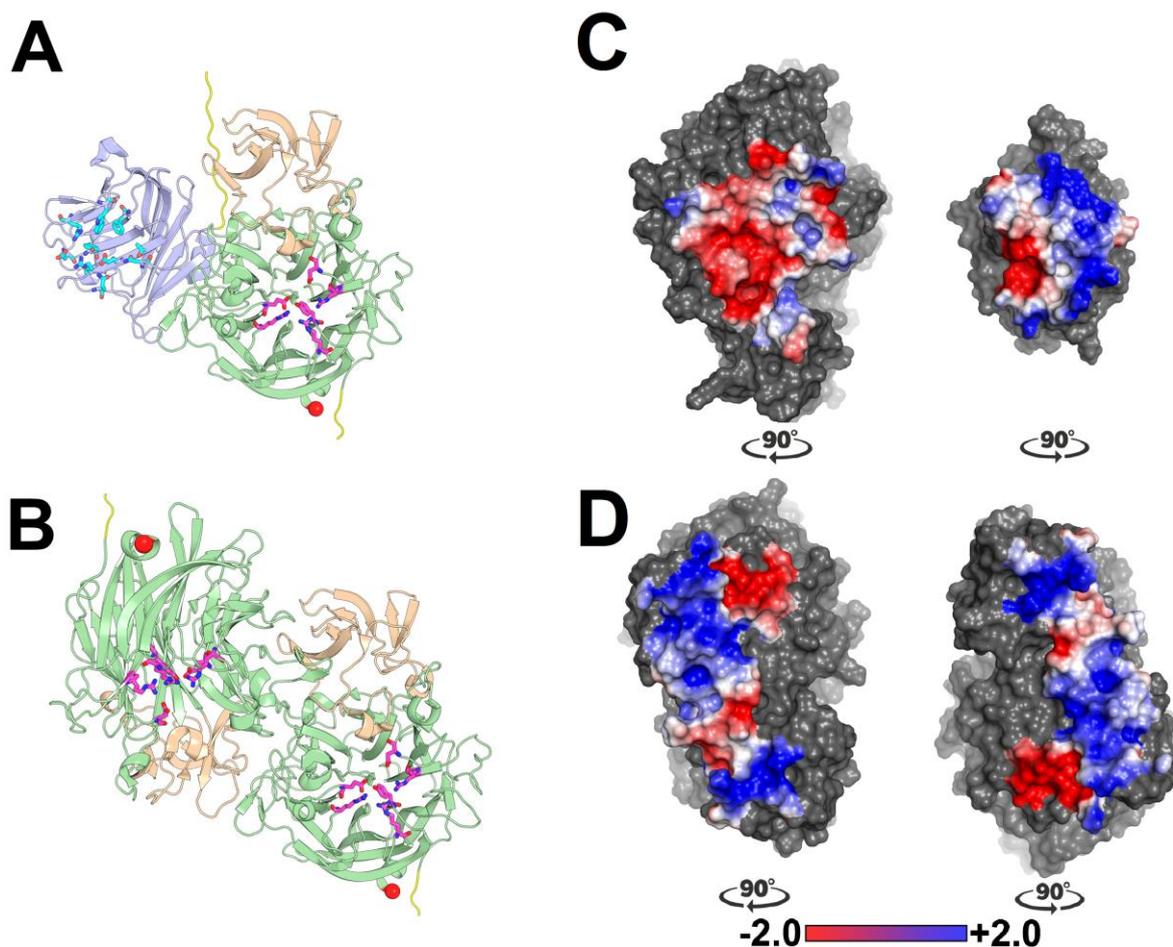
**Рисунок 2.** Ориентация доменов в структуре NanA, изученная методом молекулярной динамики. Изображения (А) и (В) соответствуют структурам, наблюдавшимся в течение 150 нс МД-траекторий при 300К. Лектиновый домен (синий) и каталитический домен (зеленый), включая инсерционный домен (бежевый), не образуют компактную глобулу и пространственно обособлены гибким линкером (желтый). Аминокислотные остатки в участке связывания субстрата лектинового домена окрашены в голубой цвет; ключевые остатки активного центра каталитического домена окрашены в розовый цвет.

Структуры всех трех нейраминидаз *S. pneumoniae* содержат N-концевой лектиновый домен, за которым следует каталитический домен, и все три белка секретируются во внеклеточное пространство; но только в NanA каталитический домен прикрепляется к клеточной стенке бактерии дополнительным С-концевым доменом. Данные о структурной подвижности, полученные методом МД, позволяют предположить, что лектиновый домен NanA может простираться в окружающую среду на всю длину междоменного линкера (рис. 2А), чтобы связаться с удаленным субстратом и таким образом зафиксировать каталитический домен у поверхностей, богатых сиаловой кислотой. Гибкий линкер может являть собой пример эволюционной адаптации NanA для преодоления ограниченной подвижности прикрепленного к поверхности бактериальной клетки каталитического домена и увеличения эффективности взаимодействия фермента с большими разветвленными полисахаридными субстратами. Эта структурная адаптация может оказывать влияние на роль белка в образовании бактерией биопленки (см. след. главу).

### Моделирование межмолекулярной агрегации NanA

Суперкомпьютерное моделирование показало, что один каталитический и один лектиновый домены, а также два каталитических домена, принадлежащие двум разным молекулам NanA, могут агрегировать, взаимодействуя через ранее неохарактеризованный междоменный интерфейс (рис. 3А и 3В), образованный

электростатически комплементарными участками взаимодействующих доменов (рис. 3С и 3D) и стабилизированной сетью межмолекулярных водородных связей и солевых мостиков. В комплексе каталитического домена с лектиновым межмолекулярная поверхность контакта располагается по «левую» сторону от каталитической субъединицы (рис. 3А и 3В), в отличие от гомологичных NanВ и NanС из *S. pneumoniae*, у которых взаимодействующие друг с другом домены относятся к одной и той же молекуле нейраминидазы, а поверхность контакта доменов находится по «правую» сторону каталитической субъединицы (рис. 1В и 1С). При этом участки связывания лигандов в этих комплексах ориентированы в одном направлении, как и в других нейраминидазах, что важно для осуществления каталитической функции. МД-симуляция показала, что структура межмолекулярных комплексов поддерживается сетью стабилизирующих взаимодействий: до 6 солевых мостиков и 5 водородных связей образуется между 14 а.о. лектинового и каталитического доменов, до 5 солевых мостиков и 10 водородных связей – между 12 а.о. из каждой каталитической субъединицы. Хотя взаимодействие между доменами различных молекул NanА ранее не обсуждалось в литературе, описанный в этой работе димер каталитического домена явно присутствует во всех доступных кристаллографических структурах этого белка, опубликованных независимыми лабораториями в период с 2008 по 2017 годы. Охарактеризованные димеры имеют определенное сходство с точки зрения топологии доменов и участвующих в димеризации элементов структуры: в обоих типах межмолекулярных комплексов NanА интерфейс взаимодействия доменов расположен по «левую» сторону каталитической субъединицы (рис. 3А и 3В), в димеризации в обоих случаях принимают участие регион 431–455, петля 609–626 и, в частности, общие для обоих комплексов остатки Glu436, Lys617 и His619, непосредственно участвующие в формировании сети стабилизирующих взаимодействий. Описанные выше интерфейсы димеризации являются специфической характеристикой, присущей NanА, но не NanВ и NanС, поскольку соответствующие аминокислотные остатки в обоих комплексах либо расположены в петле 609–626, наблюдаемой только в структуре NanА, либо заменены с заряженных типов аминокислот на полярные или гидрофобные в NanВ и NanС. Также стоит отметить, что наблюдаемое взаимодействие между каталитическим и лектиновым доменами невозможно в пределах одной молекулы NanА, поскольку этого не позволяет длина междоменного линкера [Sharapova *et al.*, 2018].



**Рисунок 3.** Пространственная организация димеров, образованных (А) каталитическим и лектиновым и (В) двумя каталитическими доменами NanA из *S. pneumoniae* согласно результатам суперкомпьютерного моделирования (домены принадлежат разным молекулам NanA). Лектиновый домен показан голубым цветом, каталитический домен – зеленым, с инсерционным доменом (бежевый), междоменный линкер в NanA – желтым. Ключевые аминокислотные остатки центров связывания субстрата выделены палочками. Электростатический потенциал поверхностей контакта между (С) каталитическим (слева) и лектиновым (справа) и (D) двумя каталитическими доменами в межмолекулярных комплексах NanA из *S. pneumoniae*. Два домена повернуты на 90° в противоположных направлениях так, чтобы поверхности контакта можно было наблюдать в одной плоскости. Электростатический потенциал показан от красного (-2 кТ/е) к синему (+2 кТ/е).

### Моделирование взаимодействия ингибитора артокарпина с новым аллостерическим центром межмолекулярной агрегации

Для установления возможной биологической роли межмолекулярной агрегации NanA было изучено влияние изопренилированного флавона артокарпина – экспериментально обнаруженного ингибитора каталитической активности NanA, также оказывающего ингибирующее действие на образование пневмококковой биопленки. Артокарпин, согласно кинетическим

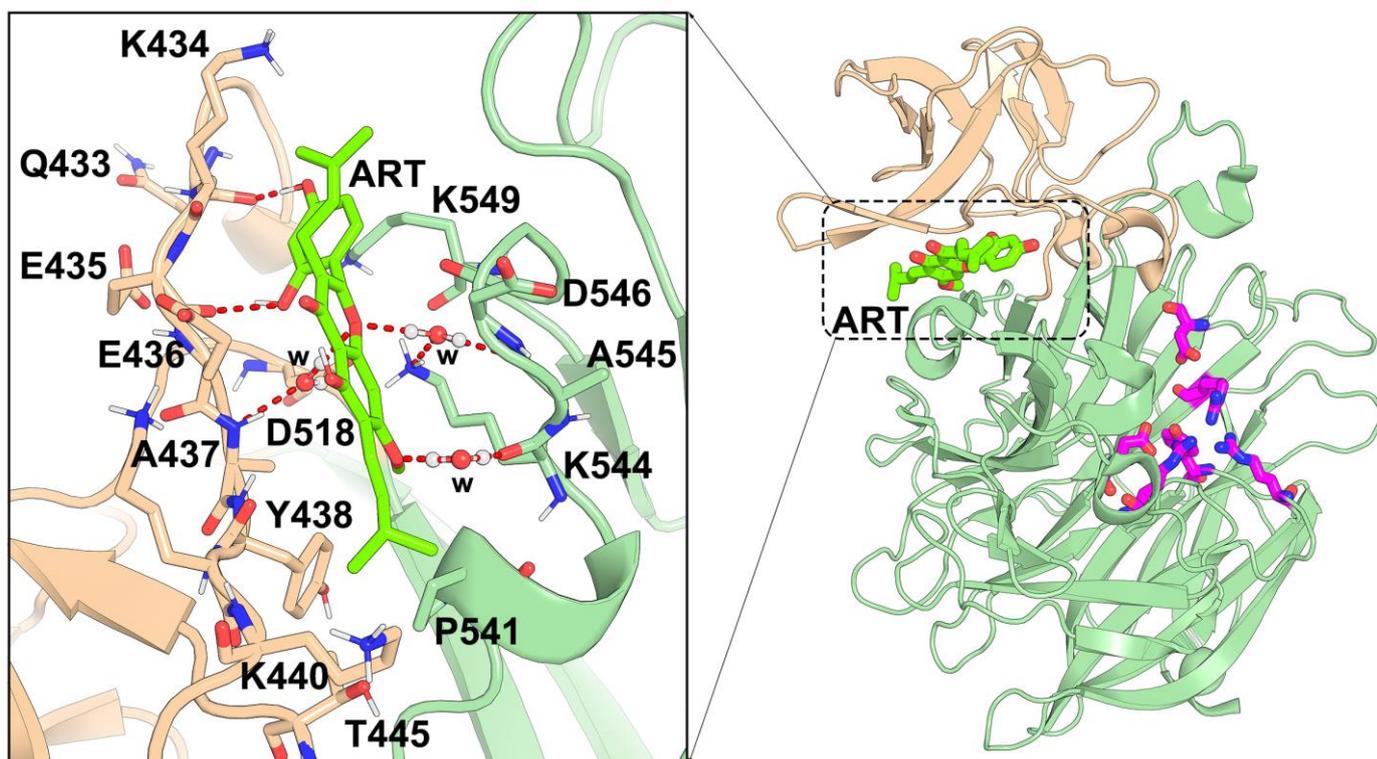
исследованиям, ингибитор смешанного типа. Исходя из этого, ранее было высказано предположение о наличии альтернативного (т.е. аллостерического) сайта связывания артокарпина, отличного от каталитического центра, однако точное место связывания лиганда в структуре NanA и механизм его действия оставались неизвестными. Проведенное нами молекулярное моделирование показало, что артокарпин может связываться в сайте, расположенном между каталитическим и инсерционным доменами (рис. 4). Оценка свободной энергии Гиббса связывания артокарпина с новым сайтом в структуре каталитического домена NanA составила  $-7,08$  ккал/моль, что эквивалентно экспериментально определенному значению  $-7,12$  ккал/моль. Артокарпин, связанный с каталитическим доменом в вышеобозначенном сайте, физически пересекается либо с лектиновым, либо с каталитическим доменом в межмолекулярных комплексах NanA (рис. 5). Связывание лиганда вызывает локальную структурную перестройку и изменение ориентации аминокислотных остатков двух доменов, что препятствует формированию межмолекулярного интерфейса и образованию стабильного межмолекулярного комплекса. Длительные МД-симуляции показали, что даже если два домена агрегируют в присутствии артокарпина, такой комплекс становится менее стабильным из-за нарушения межмолекулярных связей и снижения электростатической комплементарности интерфейса, что в конечном итоге инициирует разделение межмолекулярного комплекса на субструктуры отдельных доменов в течение 300-900 нс симуляции.

#### Роль конформационной подвижности и межмолекулярной агрегации NanA в формировании биопленок пневмококка

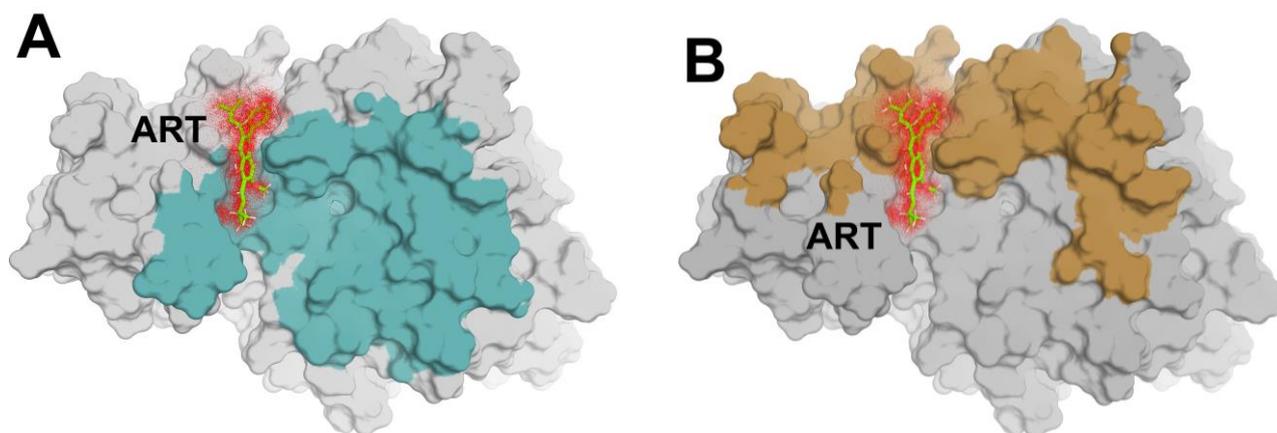
NanA является поверхностным белком: за ее каталитическим доменом следует неупорядоченная С-концевая часть длиной 244 а.о. с LPXTG-мотивом, обеспечивающая связь модульного фермента с поверхностью бактерии. Взаимодействие нескольких молекул NanA, прикрепленных длинным гибким участком их полипептидных цепей к разным клеткам пневмококка, в принципе, может приводить к образованию супрамолекулярных комплексов (рис. 6). Достоверно известно, что NanA участвует в колонизации организма-хозяина и формировании биопленок. Помимо того, что ферментативная активность способствует адгезии и активному размножению бактерии, недавние исследования свидетельствуют, что участие NanA в формировании биопленки не ограничивается лишь каталитическим отщеплением сиаловой кислоты. Экспрессия пневмококковой NanA в других бактериях приводила к образованию

ими биопленки, хотя в норме они ее не формируют; при этом ингибитор каталитической активности NanA не оказывал влияния на образование биопленки. В другом исследовании было продемонстрировано, что пневмококк, дефектный по NanA, не способен колонизировать носовую полость мышей, а также вызвать инфекцию среднего уха; коинфекции мышей вирусом гриппа А, который также обладает нейраминидазной активностью, оказалось недостаточно для того, чтобы полностью компенсировать отсутствие NanA у бактерий, что позволило предположить, что NanA участвует в формировании пневмококковой биопленки независимо от своей ферментативной активности. В том же исследовании наблюдали значительное (в 3,25 раза) снижение жизнеспособности биопленок, образованных NanA-дефектным *S. pneumoniae*, растущим на абиотической полистирольной поверхности в среде YSK, где сиаловая кислота отсутствует вовсе, по сравнению со штаммом дикого типа.

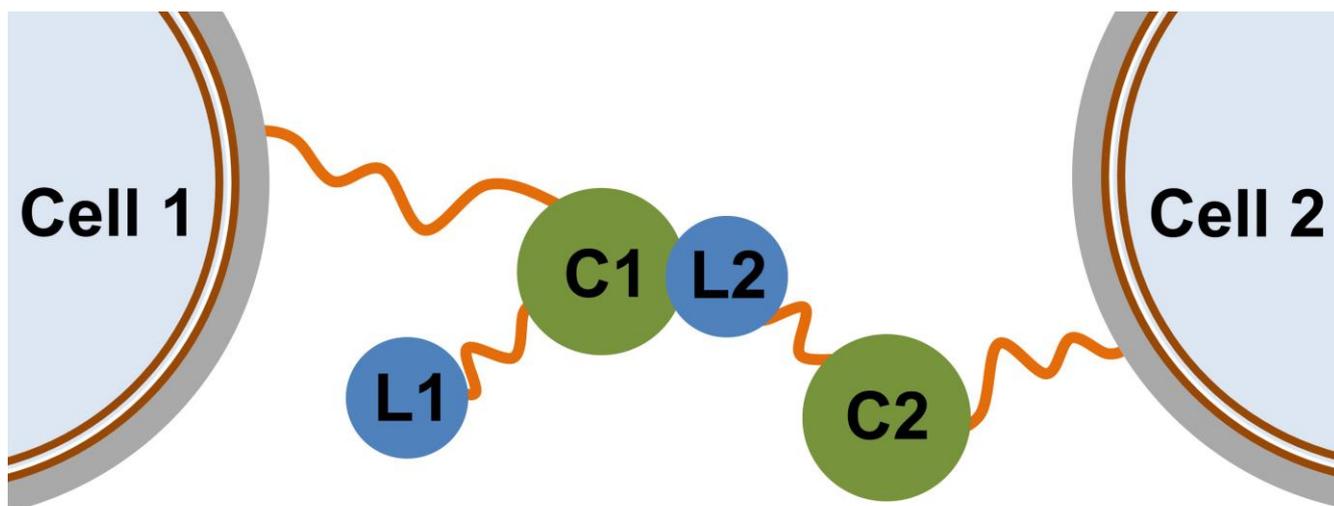
Артокарпин является природным соединением, способным как снижать каталитическую активность NanA, так и предотвращать образование пневмококковой биопленки. В рамках этой работы современные методы вычислительной биологии были использованы для изучения связывания фермента с артокарпином. Комплементарный сайт был обнаружен в той части структуры каталитического домена NanA, которая принадлежит интерфейсу связывания лектинового или каталитического домена другой молекулы NanA – связывание артокарпина, таким образом, напрямую препятствует межмолекулярной агрегации доменов и образованию биопленок *S. pneumoniae*. При этом подавление артокарпином каталитической активности NanA, по нашему мнению, обусловлено аллостерической коммуникацией между обнаруженным сайтом его связывания и каталитическим центром через гибкую петлю 425–437, которая соединяет две полости и участвует в процессе доставки субстратов в активный центр NanA; связывание артокарпина приводит к смещению петли 425–437, что в конечном итоге препятствует продуктивному связыванию субстратов в активном центре.



**Рисунок 4.** Сайт связывания артокарпина (ART) в структуре каталитического домена (включая инсерционный домен) NanA. Нумерация остатков дана в соответствии с PDB 2YA8. Знаки «w» отмечают расположение молекул воды, участвующих в мостиковых водородных связях. Для наглядности ключевые остатки активного центра каталитического домена показаны в виде палочек пурпурного цвета (как на рис. 2). Каталитический домен показан зеленым цветом, инсерционный домен – бежевым.



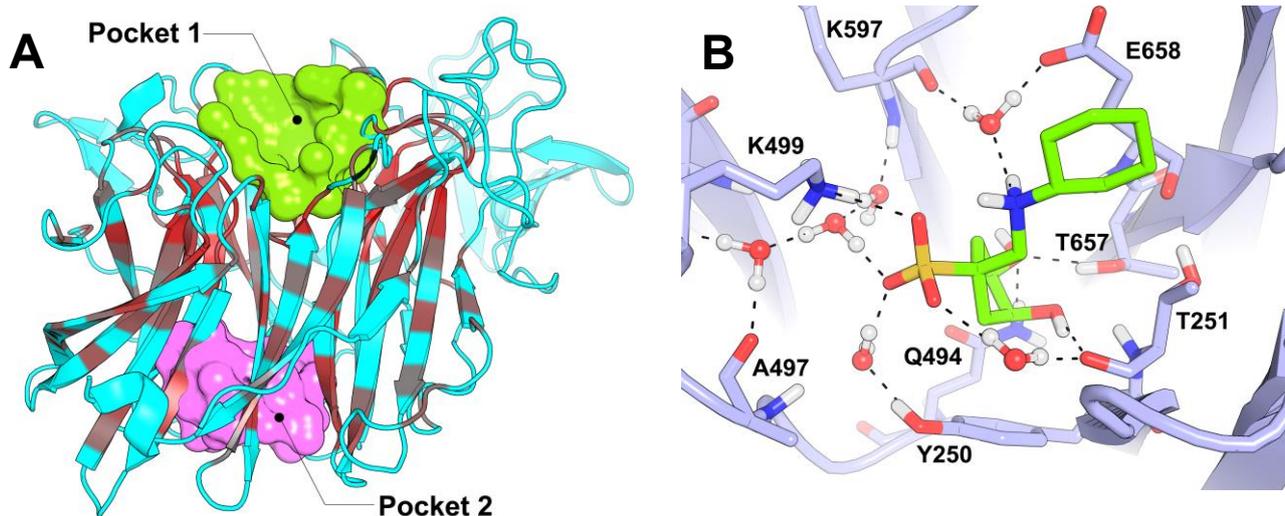
**Рисунок 5.** Центр связывания артокарпина в структуре каталитического домена NanA (серый). Участки поверхности каталитического домена, комплементарные (A) лектиновому домену и (B) каталитическому домену другой молекулы NanA в межмолекулярных комплексах, окрашены в бирюзовый и песочный оттенки, соответственно. Референсное положение артокарпина (ART) показано зелеными палочками; красные точки соответствуют фактическому положению атомов лиганда в течение 1000 нс МД-траектории.



**Рисунок 6.** Схема межмолекулярного комплекса двух молекул NanA, взаимодействующих через интерфейс между каталитическим и, как пример, лектиновым доменами, прикрепленными к разным клеткам *S. pneumoniae*. Каталитический и лектиновый домены обозначены буквами «С» и «L» и пронумерованы в соответствии с тем, какой клетке они принадлежат. Оранжевыми кривыми изображены С-концевой домен и гибкий междоменный линкер.

## **2. Подавление функциональных свойств нейраминидазы при связывании ингибиторов во втором аллостерическом центре NanA**

Биоинформатический анализ и молекулярное моделирование были использованы для изучения ранее неизвестного участка связывания в структурах гомологичных нейраминидаз пневмококка. Сравнительный анализ показал, что нейраминидазы NanA и NanB из *S. 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). Обнаружено, что в структуре NanA есть участок связывания с высоким содержанием специфических позиций, расположенный с противоположной стороны от активного центра в воронке  $\beta$ -пропеллера, который эквивалентен участку связывания ингибитора оптактина в кристаллографической структуре NanB (PDB 4XHX) (рис. 7А). 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 также играют молекулы воды (рис. 7В). Однако в NanA соответствующие остатки в структуре аллостерического сайта заменены на другие аминокислоты, что препятствует связыванию оптактина.

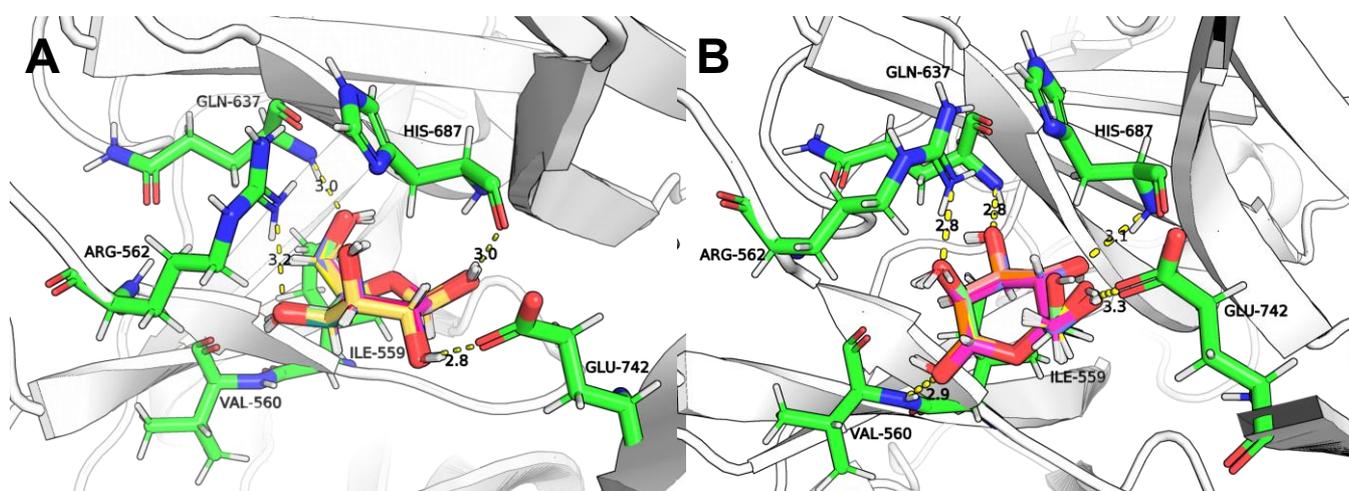


**Рисунок 7.** (А) Участки связывания лигандов в структуре NanA из *S. pneumoniae* (PDB 2YA8), предсказанные методом pocketZebra на основании биоинформатического анализа суперсемейства сиалидаз. Pocket1 соответствует ранее описанному каталитическому центру, Pocket2 – новому аллостерическому участку. Нумерация центров связывания соответствует ранжированию pocketZebra. Градиентная окраска основной цепи белка соответствует статистической оценке специфичности позиций в колонках множественного выравнивания суперсемейства сиалидаз (интенсивность красного соответствует степени специфичности). (В) Связывание ингибитора оптактина (зеленый) в аллостерическом центре NanB (PDB 4XHX) из *S. pneumoniae*. Пунктирными линиями изображены водородные и ионные связи между аминокислотными остатками белка и оптактином.

Новый аллостерический центр в NanA способен эффективно связывать сахара, входящие в состав олигосахаридных рецепторов на поверхности дыхательного эпителия человека. Изучение связывания сахаров в новом аллостерическом центре NanA проводили с помощью методов докинга и молекулярной динамики. Наиболее стабильное связывание в новом центре показано для  $\beta$ -галактозы (рис. 8А). Ориентации  $\alpha$ -маннозы (рис. 8В) и  $\alpha$ -N-ацетилнейраминовой кислоты сохранялись неизменными по меньшей мере в одной траектории из трех повторений, а в остальных случаях претерпевали незначительные изменения за счет переключения некоторых функциональных групп субстратов на взаимодействие с соседними аминокислотными остатками аллостерического центра. Наименее стабильное распознавание наблюдали для  $\beta$ -N-ацетилглюкозамина и  $\beta$ -маннозы, которые во всех повторениях МД-траекторий существенно смещались относительно первоначального положения, описанного с использованием докинга.

Недавно стало известно, что поверхностные гликозилгидролазы пневмококка, в т.ч. VgaA и NanA, могут действовать как адгезины на стадии асимптоматической колонизации пневмококком верхних дыхательных путей,

связываясь с олигосахаридными рецепторами. Последовательное действие гликозилгидролаз пневмококка и других обитателей микрофлоры может открывать доступ к этим рецепторам. Конкретные механизмы этого явления практически не изучены. Предполагается, что адгезивная способность NanA может быть связана с ее лектиновым доменом (и непосредственно участком связывания сиаловой кислоты). Наше исследование показало, что новый аллостерический центр в NanA имеет высокую аффинность к разным сахарам, что позволяет говорить о важной роли этого участка связывания в адгезии и колонизации *S. pneumoniae*.



**Рисунок 8.** Связывание  $\beta$ -галактозы (А) и  $\alpha$ -маннозы (В) в аллостерическом центре NanA из *S. pneumoniae*. Зелеными палочками показаны аминокислотные остатки в структуре NanA, которые участвуют в связывании сахаров. Желтыми пунктирными линиями показаны водородные связи, образуемые молекулой сахара с остатками аллостерического центра.

### 3. О роли консервативных и специфических остатков активного центра нейраминидаз патогенов при создании ингибиторов двойного действия

Поскольку сиалидазы являются важными факторами вирулентности для вируса гриппа и многих патогенных бактерий, в т.ч. *S. pneumoniae*, а вторичная бактериальная инфекция является главной причиной смертности при заболевании гриппом, создание ингибиторов двойного действия, способных подавлять активность обеих сиалидаз, становится популярной стратегией, чтобы разрушить «смертельный синергизм» вируса гриппа и пневмококка. Ведется активный поиск ингибиторов двойного действия путем скрининга библиотек соединений, однако пока не обнаружено ни одного вещества, ингибирующего оба фермента достаточно эффективно. Показано, что некоторые ингибиторы нейраминидазы вируса гриппа способны ингибировать NanA, однако при значительно более высоких концентрациях, чем вирусный фермент. Так,

занамибир и озельтамивир являются сильными ингибиторами вирусной нейраминидазы, действуя в нижнем наномолярном диапазоне; в то же время озельтамивир ингибирует NanA на три порядка хуже, а занамибир практически не действует. 2-дезоксид-2,3-дегидро-N-ацетилнейраминовая кислота (DANA) ингибирует оба фермента в микромолярном диапазоне (табл. 1).

**Таблица 1. Действие ингибиторов на вирусную и бактериальную нейраминидазы (среднее IC<sub>50</sub> и стандартное отклонение, мкМ).**

Ингибитор	Нейраминидаза вируса гриппа H1N1	NanA из <i>S. pneumoniae</i>
Занамибир	0,00032 ± 0,00011	Неактивен
DANA	0,59 ± 0,26	2,59 ± 0,81
Озельтамивир	0,00022 ± 0,00005	0,65 ± 0,13

Значения IC<sub>50</sub> указаны для хемилюминесцентного теста (CL-assay) и взяты из Richter, et al. (2015). *Future Virology*, **10(2)**, 77-88.

Чтобы понять, каким образом известные ингибиторы связываются и подавляют активность бактериальной и вирусной нейраминидаз, мы сравнили связывание занамивира, озельтамивира и DANA в активных центрах обоих ферментов с использованием методов компьютерной биологии, а также провели биоинформатический анализ последовательностей и структур нейраминидаз/сиалидаз из различных бактерий и вирусных штаммов. Центральная часть структур каталитических доменов бактериальных и вирусных нейраминидаз соответствует 6-лопастному-β-пропеллеру и характеризуется высокой степенью структурного сходства у гомологов из разных источников, однако периферийные элементы – петли, соединяющие β-тяжи, а также участки структуры, удаленные от центральной оси симметрии, характеризуются значительными отличиями. Консервативные позиции (Asp408, Arg648, Tyr525, Glu632, Leu551, Arg706, Asp678, Asp357, Pro334, Tyr737, Trp547, Glu753, Arg332, Val553, Gly568, Val681, нумерация по PDB: 2YA8) преимущественно локализованы в области активного центра рассмотренных ферментов и важны в контексте разработки ингибиторов двойного действия, способных подавлять активность как вирусной, так и бактериальной сиалидазы. Молекулярное моделирование комплексов NanA из *S. pneumoniae* и нейраминидазы вируса гриппа H1N1 с ингибиторами вирусного гомолога показало, что консервативные остатки в активных центрах обоих ферментов участвуют в связывании озельтамивира, DANA и занамивира. Однако разница в действии этих ингибиторов на вирусный и бактериальный гомологи в значительной степени обусловлена наличием специфических позиций в активных центрах.

Наиболее показательным в этом смысле является связывание занамивира – производного DANA, в котором О4-гидроксильная группа замещена гуанидиновой для взаимодействия со специфическими остатками Glu119 и Glu227 в активном центре вирусной нейраминидазы. Эти остатки являются специфическими для вирусных нейраминидаз, в бактериальной NanA они замещены на Leu333 и Pro555, а аналогичные отрицательно заряженные остатки расположены в пространстве по-другому. В структуре NanA, таким образом, не могут быть реализованы эффективные взаимодействия с гуанидиновой группой занамивира. Кроме того, активный центр бактериального фермента характеризуется наличием еще одной специфической позиции, которая мешает связыванию этого лиганда: боковая цепь Arg351 ориентирована в полость центра связывания и вытесняет оттуда занамивир. Молекулярный докинг наглядно показал, какие аминокислотные остатки обеспечивают эффективное связывание занамивира в активном центре вирусной нейраминидазы и какие отличия в структуре активного центра бактериального гомолога препятствуют этому. В активном центре нейраминидазы вируса гриппа также присутствуют две специфические позиции, которые при связывании озельтамивира образуют солевой мостик – Glu276 и Arg224. Неполярная поверхность, образованная их боковыми цепями, обеспечивает гидрофобное взаимодействие с 3-пентильной группой озельтамивира. В NanA эти остатки заменены на Thr631 и Gly552, что приводит к ухудшению ингибирования бактериального фермента озельтамивиром на три порядка. Результаты молекулярного моделирования согласуются с экспериментальными данными об ингибировании бактериальной и вирусной нейраминидаз (табл. 1). Таким образом, в активных центрах NanA из *S. pneumoniae* и вирусных нейраминидазах идентифицированы консервативные позиции (триаргининовый кластер, ключевые каталитические остатки Tyr, Glu и Asp), а также специфические остатки, отличающиеся у нейраминидаз из различных источников и обуславливающие селективность каждого центра. Полученные результаты создают основу для дизайна ингибиторов двойного действия, способных подавлять активность как бактериальных, так и вирусных нейраминидаз.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

- 1) Лектиновый и каталитический (включая инсерционный) домены в структуре NanA соединены подвижным, гибким линкером из 16 аминокислотных остатков в отличие от близких гомологов NanB и NanC, где соответствующие домены не разделены в пространстве и образуют компактную глобулу;
- 2) Молекулы NanA, прикрепленные к клеточной стенке разных клеток пневмококка, способны образовать межмолекулярные агрегаты за счет взаимодействия их лектиновых и каталитических доменов, что может являться одним из механизмов формирования биопленок пневмококком;
- 3) Механизм действия артокарпина – ингибитора формирования биопленок пневмококком, основан на его взаимодействии с аллостерическим центром на поверхности каталитического домена, расположенным в области контакта с лектиновым или каталитическим доменом другой молекулы NanA при межмолекулярной агрегации;
- 4) В структуре NanA есть второй аллостерический центр, топологически независимый от активного центра и расположенный в воронке на противоположной стороне шестилопастного  $\beta$ -пропеллера каталитического домена фермента;
- 5) Второй аллостерический центр в NanA эквивалентен ранее описанному аллостерическому центру в гомологичной сиалидазе NanB пневмококка, однако не обладает достаточным сродством к низкомолекулярному лиганду оптактину, аллостерическому ингибитору NanB, в связи с заменами аминокислотных остатков в ключевых позициях данного участка связывания;
- 6) Второй аллостерический центр в NanA способен эффективно связывать сахара, входящие в состав олигосахаридных рецепторов эпителия верхних дыхательных путей человека, в том числе  $\beta$ -галактозу,  $\alpha$ -маннозу,  $\alpha$ -N-ацетилнейраминовую кислоту, что свидетельствует о роли этого участка связывания в адгезии и колонизации *S. pneumoniae*;
- 7) В активных центрах NanA из *S. pneumoniae* и вирусных нейраминидазах идентифицированы консервативные позиции (триаргининовый кластер, ключевые каталитические остатки Tyr, Glu и Asp), а также специфические

остатки, отличающиеся у нейраминидаз из различных источников и обуславливающие селективность каждого центра. Полученные результаты создают основу для дизайна ингибиторов двойного действия, способных подавлять активность как бактериальных, так и вирусных нейраминидаз.

## НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В ЖУРНАЛАХ WEB OF SCIENCE, SCOPUS, RSCI<sup>1</sup>

1. **Sharapova Y.**, Švedas V., Suplatov D. (2021) Catalytic and lectin domains in neuraminidase A from *Streptococcus pneumoniae* are capable of an intermolecular assembly: Implications for biofilm formation. *The FEBS Journal* **288**(10):3217-3230; DOI:10.1111/febs.15610; IF (Web Of Science) 5.54 (1,33/1,0);
2. **Sharapova Y.**, Suplatov D., Švedas V. (2018) Neuraminidase A from *Streptococcus pneumoniae* has a modular organization of catalytic and lectin domains separated by a flexible linker. *The FEBS journal* **285**(13):2428-2445; DOI:10.1111/febs.14486, IF (Web Of Science) 5.54 (1,70/1,27);
3. **Sharapova Y. A.**, Suplatov D. A., Švedas V. K. (2018) Simulating the long-timescale structural behavior of bacterial and influenza neuraminidases with different HPC resources. *Supercomputing Frontiers and Innovations* **5**(3):30-33; DOI:10.14529/jsfi180303, CiteScore (Scopus) 2.9 (0,3/0,15);
4. **Шарапова Я. А.**, Швядас В. К. (2018) Молекулярное моделирование связывания аллостерического ингибитора оптактина в новом сайте в структуре нейраминидазы а из *Streptococcus pneumoniae*. *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия* **59**(5):323-331; DOI:10.3103/S0027131418050097, CiteScore (Scopus) 0.52 (0,73/0,55).

## ПУБЛИКАЦИИ В МАТЕРИАЛАХ НАУЧНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ

1. **Шарапова Я.А.** (2020). Моделирование подвижных участков связывания лигандов в активном центре NanA из *Streptococcus pneumoniae*. //XXV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2020», 10-27 ноября 2020, Москва, Россия;
2. **Sharapova Y.**, Suplatov D., Timonina D., Schmalhausen E., Fesko K., Muronets V., Voevodin V., Švedas V. (2019). Assessing protein flexibility in computational

---

<sup>1</sup> В скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах.

- enzymology: conformational sampling or 3D-motif analysis? //44<sup>th</sup> FEBS Congress: From Molecules to Living Systems, 6-11 июля 2019, Краков, Польша;
3. **Sharapova Y.**, Suplatov D., Švedas V. (2019). Neuraminidase A from *Streptococcus pneumoniae*: Three Different Ways to Modulate Enzyme Activity. //Moscow Conference on Computational Molecular Biology «MCCMB'19», 28-31 июля 2019, Москва, Россия;
  4. **Шарапова Я.А.**, Суплатов Д.А., Швядас В.К. (2019). Поиск нового центра связывания артокарпина в структуре NanA из *Streptococcus pneumoniae* с учетом конформационной пластичности белка. //Суперкомпьютерные дни в России «RuSCDays'19», 23-24 сентября 2019 г., Москва, Россия;
  5. **Шарапова Я.А.** (2019). Поиск новых путей регуляции функциональных свойств нейраминидазы А как ключевого фермента патогенеза *Streptococcus pneumoniae* с использованием методов компьютерной биологии. //XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2019», 8-12 апреля 2019, Москва, Россия;
  6. **Шарапова Я.А.** (2018). Молекулярное моделирование гомологичных нейраминидаз NanA, NanB и NanC из пневмококка выявило принципиальные различия в подвижности каталитических и лектиновых доменов в их структурах. //XXV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2018», 9-13 апреля 2018, Москва, Россия;
  7. **Sharapova Y.**, Suplatov D., Švedas V. (2017). Molecular Modeling of Catalytic and Lectin Domains in Neuraminidase A from *Streptococcus pneumoniae*. //Moscow Conference on Computational Molecular Biology «MCCMB'17», 27-30 июля 2017, Москва, Россия;
  8. **Sharapova Y.A.**, Švedas V.K. (2016). Homologous Bacterial And Viral Sialidases Have Different Organization Of Their Catalytic Sites. //International Symposium «Systems Biology and Bioinformatics» SBBI-2016, 30 июня - 2 июля 2016 г., Санкт-Петербург, Россия;