

УДК 582.23:576:577+57.04:004

ЛІГАНД-ІНДУКОВАНА МІНЛИВІСТЬ КИШЕНІ САЙТУ МІЖДОМЕННОЇ ЩІЛИНИ FtsZ БІЛКУ БАКТЕРІЙ

Д.С. ОЖЕРЕДОВ, С.П. ОЖЕРЕДОВ, О.М. ДЕМЧУК, Я.Б. БЛЮМ, П.А. КАРПОВ *

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, вул. Байди Вишневецького, 2а, Київ, 04123, Україна

E-mail: karpov@nas.gov.ua *; karpov@ifbg.org.ua*

Автор для кореспонденції – Карпов П.А., e-mail: karpov@nas.gov.ua, karpov@ifbg.org.ua

*Досліджена варіабельність кишені алостеричного сайту, розташованого у міждоменній щілині (IDC) FtsZ білків. За допомогою методу «point-cloud» побудовано просторові моделі кишень сайту IDC для 11-ти комплексів FtsZ білку *Staphylococcus aureus* із похідними 2,6-діфлюоробензаміду: OLQ, 9PC, OM8, OMW Z11, Z16, Z17 та Z19, депонованими в RCSB Protein Data Bank. Продемонстровано значну мінливість об'єму і форми кишені сайту IDC, що формується внаслідок адаптації до ліганду. Визначено чотири домінуючі конформаційні стани кишені цільового сайту, що виникають внаслідок ліганд-білкового припасування. Отримані результати свідчать про те, що докінг низькомолекулярних сполук у сайт IDC індивідуальних моделей молекул FtsZ білку є не ефективним. Зроблено висновок, що результати віртуального скринінгу можуть бути значно покращені за рахунок використання ансамблю мішеней, що враховує конформаційну мінливість сайту IDC молекул FtsZ білку бактерій.*

Ключові слова: FtsZ, сайт IDC, ліганд-білкове припасування, інгібітори.

Вступ. FtsZ білки є основними структурними та функціональними елементами апарату бінарного поділу бактерій, завдяки чому розглядаються як одна з першочергових молекулярних мішеней при розробці нових антибіотиків (Karpov et al, 2016; Pradhan et al, 2021). Мономери FtsZ білку здатні до самостійної полімеризації в одноланцюгові нитки завдяки автономному механізму перемикання між неактивною та активною (здатною до полімеризації) конформаціями (Artola et al, 2017). Водночас,

збірка Z-кільця регулюється низкою ендогенних білків-активаторів та інгібіторів, які відповідають за баланс між нестабільним і стабільним станами FtsZ-білку (Hale, de Boer, 1997; Trusca et al, 1998; Pichoff and Lutkenhaus, 2002; Haeusser et al, 2004; Pradhan et al, 2021). Надмірна експресія генів, що відповідають за синтез природних інгібіторів FtsZ-білку (SulA, MinCD тощо) або, навпаки, інактивація білків, що стабілізують його структуру (FtsA, ZipA або Zap) в *Escherichia coli*, призводить до формування довгих ниткоподібних клітин. Такі клітини не містять Z-кільця або несуть його множинні рудиментарні аналоги (Addinall et al, 1996), що має летальні наслідки для бактеріальної клітини (Pradhan et al, 2021). Аналогічно, певні низькомолекулярні сполуки здатні пригнічувати утворення Z-кільця або викликають його надмірну стабілізацію, яка також призводить до блокування цитокінезу. З огляду на те, що FtsZ-білок є найважливішим компонентом Z-кільця бактерій, пошук речовин, здатних специфічно зв'язуватись з ним, вимагає глибокого розуміння просторової структури зазначеного білку, визначення можливих сайтів зв'язування відповідних лігандів та зв'язування молекулярних механізмів реалізації впливу таких ефекторів на його функціонування (Demchuk et al, 2011; Pradhan et al, 2021).

З точки зору ліганд-залежного впливу на FtsZ-білок, першочергове значення мають дві кишені зв'язування лігандів на поверхні його молекули: сайт взаємодії з ГТФ (домен зв'язування нуклеотидів), розташований на межі

між субдодиницями полімеру (Addinall et al, 1996), та міждоменна щілина (IDC = Inter-Domain Cleft) (Haeusser et al, 2004; Wagstaff et al, 2017), розташована між N- і C-кінцевим сегментами глобулярної частини молекули (Bi and Lutkenhaus, 1991; Pichoff and Lutkenhaus, 2002; Wagstaff et al, 2017). Сайт IDC розташований під спіраллю H7 та безпосередньо прилягає до петлі T7 і також іноді згадується як алостеричний сайт, або сайт зв'язування бензамідів (Pichoff and Lutkenhaus, 2002; Wagstaff et al, 2017; Wang et al, 2020). Цей сайт охоплює досить велику частину поверхні молекули FtsZ-білку і за розташуванням гомологічний сайту зв'язування таксолу у молекулі β -тубуліну (Casiraghi et al, 2020). Вважається, що механізм структурного перемикавання мономеру FtsZ-білку відбувається за рахунок зміщення C- та N-кінцевих доменів, які обумовлюють конформаційні зміни IDC (Wagstaff et al, 2017). В свою чергу, це супроводжується появою алостеричних ефектів, які й призводять до підвищення жорсткості міжсубдолинних інтерфейсів філаменту (Elsen et al, 2012, Wagstaff et al, 2017). Цей механізм підтверджується кристалографічними даними щодо полімерного та мономерного станів FtsZ-білку (Matsui et al, 2012; Wagstaff et al, 2017) та структури комплексів FtsZ-білку з алостеричними ефекторами (Matsui et al, 2012; Tan et al, 2012; Fujita et al, 2017; Wagstaff et al, 2017; Ferrer-González et al, 2019; Huecas et al, 2021; Bryan et al, 2023), а також результатами використання вище зазначених ефекторів (Andreu et al, 2010) та розроблених на їх основі флюоресцентних зондів (Artola et al, 2017; Huecas et al, 2021) на живих культурах бактерій.

За даними літератури такі сполуки, як дифторбензамід (PC190723) (3-((6-хлортіазоло[5,4-b]піридин-2-іл)метокси)-2,6-дифтор-бензамід), зв'язуються в ділянці IDC, провокуючи алостеричний зсув спіралі H7, що також обумовлює виникнення деформацій ГТФ-азного домену (Miguel et al, 2015; Wagstaff et al, 2017). При цьому вважається, що сполуки, які конкурентно взаємодіють із сайтом зв'язування ГТФ, є більш цитотоксичними для ссавців через виражену подібність сайтів ГТФ/ГДФ бактеріальних FtsZ-білків і ізотипів тубуліну

ссавців (Pradhan et al, 2021). Натомість міждоменна щілина FtsZ-білків демонструє меншу подібність з тубуліном як за амінокислотним складом, так і за просторовою структурою. Це обумовлює її привабливість як цільового сайту при розробці антибіотиків, що мають характеризуватись більш низькою токсичністю для еукаріотів (Pradhan et al, 2021).

Слід зазначити, що впродовж останнього часу було ідентифіковано ряд сполук як природного, так і синтетичного походження, що ефективно взаємодіють із сайтом IDC. Так, на поточний момент в RCSB Protein Data Bank депоновано 16 структур FtsZ-білку із *Staphylococcus aureus* в комплексі з вісьмома алостеричними ефекторами: 9PC (PC190723; PDB: 4DXD, 3VOB) (Matsui et al, 2012; Tan et al, 2012), OLQ (PDB: 6YD1), OM8 (PDB: 6YD5), OMW (PDB: 6YD6) (Huecas et al, 2021), ZI7 (PDB: 5XDT), ZI6 (PDB: 5XDU, 5XDV) (Fujita et al, 2017), ZI9 (PDB: 8HTB) (Bryan et al, 2023), ZI1 (PDB: 6KVP)/DVX (PDB: 6KVQ; ZI1+BODIPY (бор-дипірометен флюорофор)) (Ferrer-González et al, 2019). Слід зазначити, що взаємодія з FtsZ-білком всіх вказаних ефекторів підтверджується комплексами, депонованими в RCSB Protein Data Bank, і всі вони належать до похідних 2,6-дифторбензаміду. Проте, незважаючи на спільну хімічну природу, кристалографічно доведені комплекси демонструють конформаційну унікальність лігандів і цільової кишені. Спроби докінгу вказаних референтних лігандів у цільовий сайт з використанням окремих структур, депонованих у RCSB Protein Data Bank, а також моделей, побудованих за допомогою сервісів AlphaFold (Jumper et al, 2021), Swiss-Model (Waterhouse et al, 2018) та I-Tasser (Zhou et al, 2022), доводять неможливість посадки всієї контрольної групи лігандів в IDC кишеню цільового сайту дискретних мішеней. Також у ряді випадків пози докінгу явно відрізнялись від структур контрольних комплексів з RCSB Protein Data Bank. Цю проблему також не вдається вирішити і при використанні різних протоколів жорсткого та гнучкого докінгу в CCDC GOLD (Jones et al, 1997). Оскільки така варіабельність результатів докінгу була визначена на прикладі PDB-структур FtsZ-білку *S. aureus*, отриманих у комплексі з різними

лігандами, все це свідчить про значні флуктуації об'ємів і форми цільової кишені, що, в свою чергу, вказує на значний внесок фактору ліганд-білкового припасування, або ліганд-білкової адаптації (Ballante et al, 2021; Di Cera, 2020). Саме тому метою нашого дослідження стало вивчення конформаційних станів (форми та об'єму) сайту IDC з використанням кристалографічно доведених комплексів FtsZ-білку з лігандами, які специфічно взаємодіють із зазначеним сайтом і депоновані в RCSB Protein Data Bank. Сподіваємося, що представлені результати допоможуть зрозуміти причини відхилень у зв'язуванні контрольних лігандів та дозволять оптимізувати CADD (Computer-Aided Drug Design) протоколи молекулярного докінгу та віртуального скринінгу.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження були структури RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org) FtsZ-білку *S. aureus* (SaFtsZ) в комплексі з алостеричними ефекторами: 4DXD, 3VOB (Matsui et al, 2012; Tan et al, 2012), 6YD1, 6YD5, 6YD6 (Huecas et al, 2021), 5XDU, 5XDV (Fujita et al, 2017), 8HTB (Bryan et al, 2023), 6KVP та 6KVQ (Ferrer-González et al, 2019).

Структурну модель апо-форми SaFtsZ-білку (UniProtKB: P0A02 FTSZ_STAAM) із закритою конформацією сайту ID було отримано з репозиторію моделей AlphaFold (UniProtKB#: AF-P0A029-F1) ресурсу UniProtKB (UniProt Consortium, 2023; Cramer, 2021; Jumper et al, 2021). Структурні моделі SaFtsZ-білку з відкритими конформаціями сайту IDC було побудовано за допомогою серверу Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org>) з використанням шаблонних PDB-структур 3VOA і 3VOB (Waterhouse et al, 2018).

Візуалізацію та аналіз молекулярних структур виконували з використанням програмного забезпечення PyMOL v.2.5.5 (Schrödinger LLC, www.pymol.org) і BIOVIA Discovery Studio 2021 Client (<https://discover.3ds.com/>). Аналіз порожнин кишені сайту зв'язування здійснювали за допомогою технології Catalophore™, що була реалізована за допомогою плагіну Innophore CavitOmiX (версія 1.0, 2022, Innophore GmbH – <https://innophore.com/cavitomix>), інтегрованого в програму PyMOL. При цьому гідрофобність порожнин розраховували з використанням інтегрованого модуля VASCo (Steinkellner et al,

2009), а об'єм сайтів визначали з використанням модифікованого алгоритму LIGSITE (Hendlich et al, 1997). Деякі попередні дослідження ліганд-білкової взаємодії були проведені за допомогою програми CCDC GOLD 2023.2.0 (Build 382240) (Jones et al, 1997).

Результати та обговорення. Розуміння нюансів білок-лігандної взаємодії є основною вимогою для успішного дизайну та комбінаторного синтезу нових ефекторних молекул. Раніше Wagstaff та ін (2017) представили рентгенівські структури FtsZ білку із *S. aureus* (SaFtsZ) у різних станах: із закритим алостеричним сайтом, відкритою кишенею та в комплексі з алостеричним ефектором PC190723 (депоновано в RCSB Protein Data Bank як 9PC) (Wagstaff et al, 2017). В цьому дослідженні був продемонстрований та структурно доведений «ефект доміно» у перебудовах вторинної структури, зокрема, зміщення C- та N-кінцевих доменів, що ініціює конформаційні зміни-перемикання в міждоменній щілині FtsZ-білку (IDC) (Wagstaff et al, 2017).

Результати аналізу структурної моделі SaFtsZ-білку, побудованої за допомогою AlphaFold (UniProtKB: P0A029/FTSZ_STAAM) (UniProtKB #: AF-P0A029-F1), підтвердили закрити «CLOSED» конформацію алостеричної кишені у апо-форми цільового білку (рис. 1). Моделювання за допомогою сервісу Swiss-Model та шаблонів 3VOA і 3VOB дозволило реконструювати моделі структури SaFtsZ-білку з достатньо відкритою конформацією сайту IDC. При цьому об'єми кишень IDC виявлялись більш-менш подібними до конфігурацій «відкритих» сайтів, а результати молекулярного докінгу були подібними до результатів докінгу з використанням PDB-структури 3VOA. Слід зазначити, що найбільш результативним був докінг контрольної групи лігандів з використанням білкового компонента PDB-структури 3VOB – SaFtsZ з PC190723/9PC (PDB DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb3VOB/pdb>). Однак навіть для цього випадку лише частина референтних лігандів була успішно докована у кишеню цільового сайту. Крім того, позиції деяких лігандів у кишені сайту IDC відрізнялися від тих, що спостерігали у кристалографічно доведених структурах RCSB Protein Data Bank. Так, у зв'язку з великим розміром окремі представ-

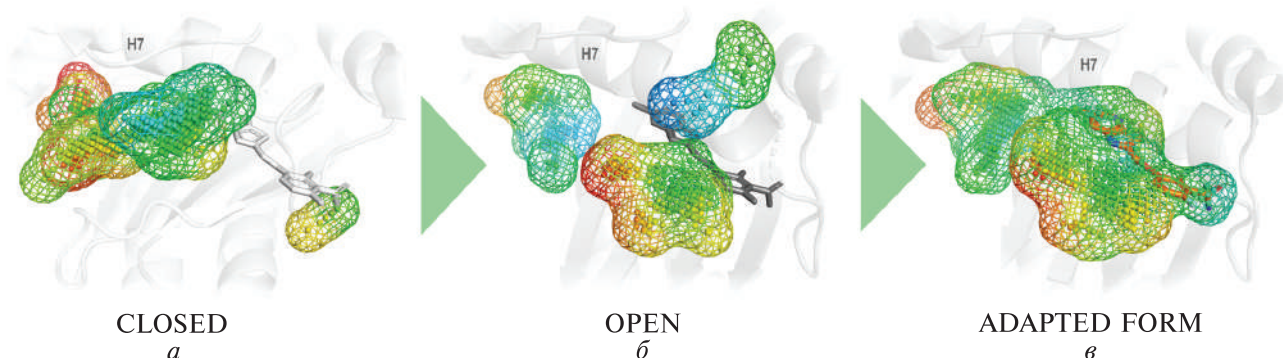


Рис. 1. Конформаційна мінливість (форми та об'єму) алостеричного сайту FtsZ білку *S. aureus*: *a* – «CLOSED» – закрита конформація сайту в мономері FtsZ (PDB: 5MN6/SaFtsZ +GDP); *б* – «OPEN» – відкрита конформація сайту в мультисубодиничному комплексі (PDB: 3VOA); *в* – «ADAPTED FORM» – кишень сайту SaFtsZ-білку, що утворюється внаслідок процесів ліганд-білкової адаптації з канонічним алостеричним ефектором PC19072 9PC (PDB: 3VOB). *Примітка.* Аналіз об'єму сайту виконувався за допомогою плагіну CavitOmiX (<https://innophore.com/cavtomix/>), інтегрованого у програму PyMOL. З метою кращого розуміння положення кишень на рисунках «*a*» та «*б*» ліганд PC190723 був перенесений з експериментального комплексу (PDB : 3VOB) за допомогою методу структурного вирівнювання просторових структур і він не є частиною представлених моделей (позначено білим і сірим кольором відповідно)

ники зантринів (зокрема, ZI1, ZI6 і ZI7) виявилися не здатними розташуватися у цільовій кишеньці мішені, що суперечить даним кристаллографії (PDB: 5XDT, 5XDU, 5XDV і 6KVP) та даним, отриманим з використанням біохімічних методів (Sun et al, 2018). Це дозволяє припустити, що при взаємодії вищезгаданих сполук з FtsZ-білком відбуваються більш значні і унікальні перебудови кишень цільового сайту, що пов'язано з індивідуальними особливостями ліганд-білової адаптації та потенціалом конформаційної мінливості кишень сайту (дихальні рухи, суміжні кишеньці, утворення кишень другого порядку тощо) (Stank et al, 2016).

Як було зауважено раніше, аналіз FtsZ білків з RCSB Protein Data Bank у комплексі з ефекторами сайтів IDC свідчить про те, що всі розглянуті алостеричні ліганди належать до похідних 2,6-дифторбензаміду, що, в свою чергу, вказує на функціональну роль цієї групи в утворенні комплексу. Крім того, раніше було депоновано PDB-структуру 6YD1 (*SaFtsZ-DFMBA S. aureus*) (Matsui et al, 2012) у комплексі з 2,6-дифтор-3-метоксибензамідом (PDB: OLQ), який є мінімальним похідним хімічного ряду 2,6-дифторбензамідів (рис. 2). На основі аналізу комплексу 6YD1, а також PDB-структур 3VO8, 3VO9, 3VOA, 3VOB, 3VPA було доведено, що 2,6-дифторбензамідний фраг-

мент є принципово важливим для взаємодії із сайтом IDC (Matsui et al, 2012). Було виявлено, що патерн взаємодії OLQ з FtsZ в комплексі 6YD1 також присутній і в інших структурах, які містять алостеричні ліганди у сайті IDC, а положення цієї групи в кишеньці сайту стабільне для всієї контрольної групи лігандів.

В той же час локалізація в кишеньці варіабельних груп радикалів (R), приєднаних до 2,6-дифторбензаміду, може істотно різнитися. Результати аналізу комплексу 2,6-дифторбензаміду із сайтом IDC FtsZ білку вказують на те, що вона залежить від кількох типів взаємодії (рис. 2). Так, взаємодія ацетамідної групи лігандів з амінокислотними залишками Val-207, Leu-209 і Asn-263 опосередковується водневими зв'язками. Також атом кисню (=O²) цієї групи бере участь у формуванні метало-акцепторної взаємодії з кофактором (K⁺ або Ca²⁺), а дві фторидні (-F¹² і -F¹³) групи утворюють консервативні галогенні зв'язки із залишками Val-203 і Asn-263. У той же час залишки Asn-263 і Leu-200 утворюють з даною групою доступний для розчинника гідрофільний контакт, а залишок Leu-200 формує π-алкільну взаємодію з арильним фрагментом лігандів. Суттєвий внесок у зв'язування циклічного фрагменту 2,6-дифторбензаміду вносять гідрофобні взаємодії із амінокислотними залишками Asp-199 (амід-π сте-

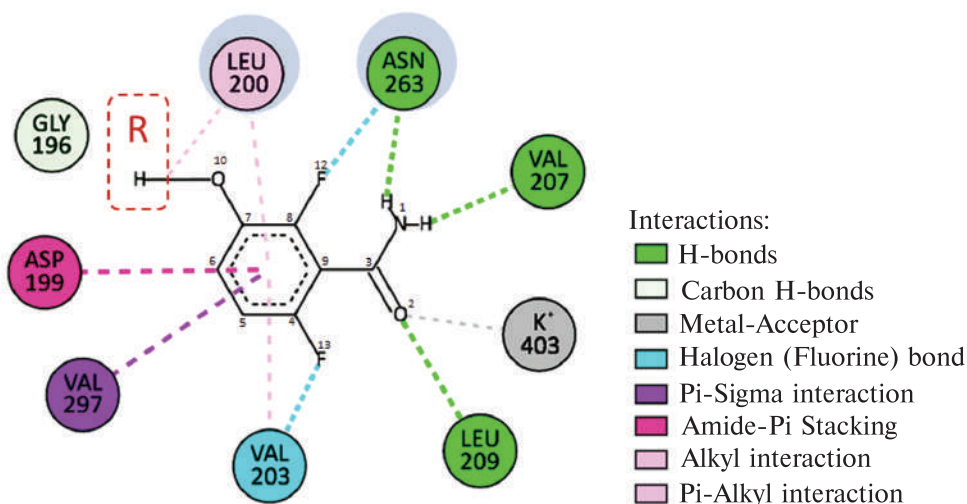


Рис. 2. Приклад карти білок-лігандної взаємодії алостеричного ефектора FtsZ-білку – OLQ (2,6-дифтор-3-метоксибензамід) із сайтом міждоменної щілини SaFtsZ-білку (структура PDB 6YD1 – SaFtsZ-DFMBA *S. aureus*). Показана ключова роль фрагменту 2,6-дифторбензаміду у зв'язуванні всіх досліджуваних лігандів (PDB: OLQ, 9PC, OM8, OMW, ZI1, ZI6, ZI7 та ZI9) з сайтом IDC. R – вказує на місце приєднання варіабельних радикалів до групи 2,6-дифторбензаміду через ефірний місток

кінгова взаємодія), Val-203 (алкільна взаємодія) і Val-297 (π -сигма взаємодія). Майже повністю ідентичні взаємодії 2,6-дифторбензамідної групи були підтверджені для всіх восьми проаналізованих лігандів (OLQ, 9PC, OM8, OMW, ZI1, ZI6, ZI7 і ZI9), що вказує на консервативне положення цієї функціональної групи у кишені сайту IDC для цих лігандів.

Щоб зрозуміти особливості деформацій сайту IDC та його зміни, викликані ліганд-білковою адаптацією, нами було застосовано «point-cloud» метод технології Catalophore™. Одночасно були побудовані індивідуальні «point-cloud» моделі об'ємів сайтів IDC для всіх 11-ти комплексів PDB білків FtsZ *S. aureus* з алостеричними ефекторами – похідними 2,6-дифторбензаміду: OLQ, 9PC, OM8, OMW, ZI1, ZI6, ZI7 та ZI9 (рис. 3). Структурне вирівнювання отриманих комплексів дозволило порівняти форму та об'єм кишень та згрупувати їх за подібністю. Як і очікувалося, найбільш регулярною і стабільною частиною кишені для всіх моделей була ділянка, в якій розташовується фрагмент 2,6-дифторбензаміду. Також було визначено три основні типи розподілу об'єму кишені IDC білок-лігандних комплексів на основі подібності об'єму та форми «point-cloud» моделей кишені.

Найпростіша форма кишені була ідентифікована для раніше описаної структури 6YD1 комплексу SaFtsZ-білку з найбільш мінімалістичним представником групи 2,6-дифторбензамідів – OLQ (2,6-дифтор-3-метоксибензамід), яку було промарковано як тип «1» (рис. 3, «1»). Відповідно, до групи «2» увійшли чотири комплекси (4DXD, 3VOB, 6YD5 і 6YD6) з трьома лігандами: 9PC/PC190723 (3-[(6-хлоро[1,3]тіазоло[5,4-*b*]піридин-2-іл)метокси]-2,6-дифторбензамід), OM8 (3-[(3-хлорфеніл)метокси]-2,6-біс(флюораніл)бензамід) та OMW (2,6-біс(флюораніл)-3-[[3-(трифторметил)феніл]метокси]бензамід) (рис. 3, «2»). До групи «3» (рис. 3, «3») увійшли п'ять комплексів з 2,6-дифторбензамідами групи зантринів (5XDV, 5XDU, 5XDT, 6KVP та 6KVQ) (Fujita et al, 2017; Sogawa et al, 2020; Yamamoto et al, 2020): ZI1 (3-[(1R)-1-[5-броманіл-4-[4-(трифторметил)феніл]-1,3-оксазол-2-іл]етокси]-2,6-біс(флюораніл)бензамід), ZI6 (3-[[5-броманіл-4-[4-(трифторметил)феніл]-1,3-оксазол-2-іл]метокси]-2,6-біс(флюораніл)бензамід), ZI7 (2,6-біс(флюораніл)-3-[[6-(трифторметил)-[1,3]тіазоло[5,4-*b*]піридин-2-іл]метокси]бензамід) і DVX (3-[(6-етиніл)-[1,3]тіазоло[5,4-*b*]піридин-2-іл)метокси]-2,6-біс(флюораніл)бензамід).

Слід зауважити, що, як вже згадувалося раніше, ліганд DVX є флюоресцентним про-

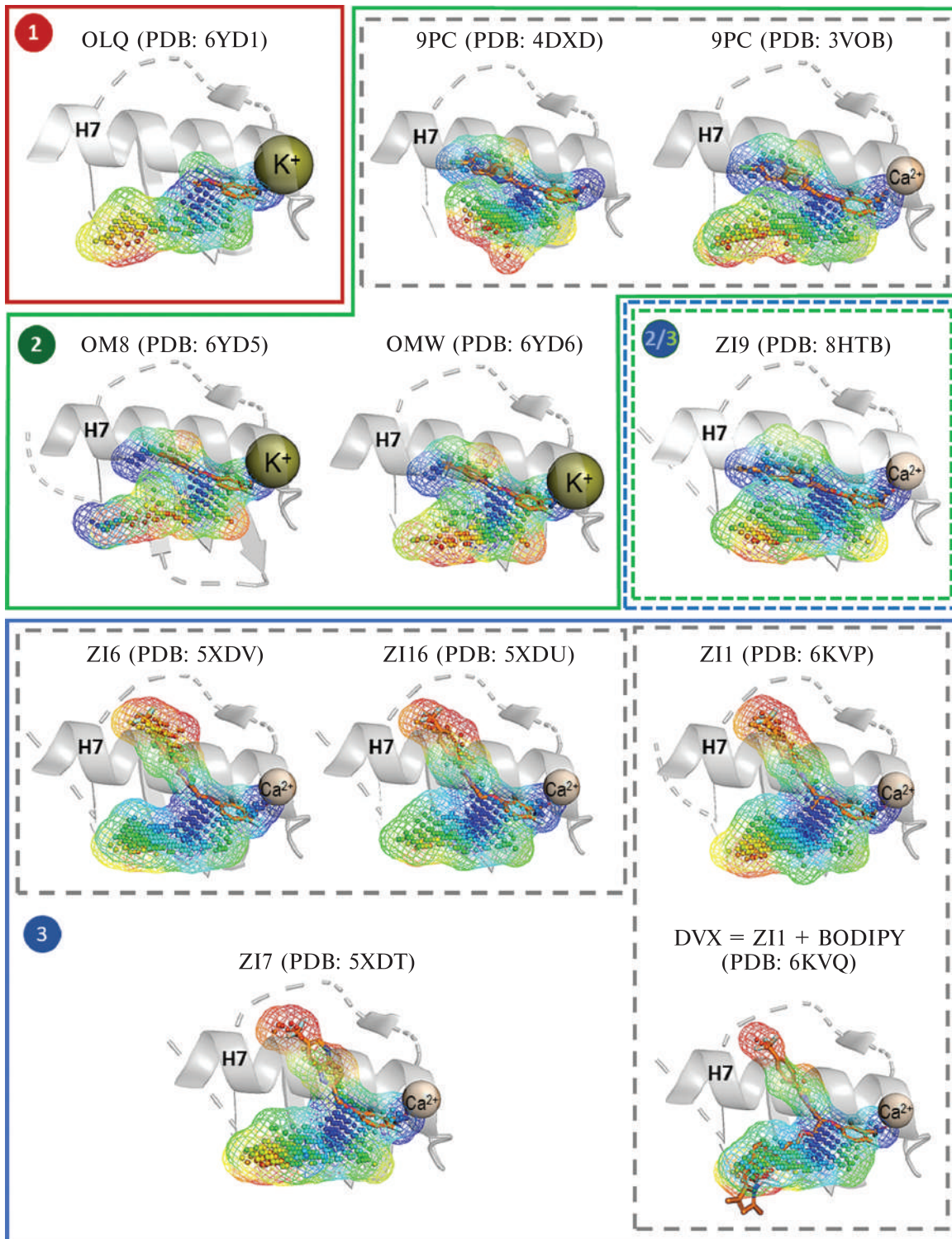


Рис. 3. Ранжування кишень сайту міждоменої щілини (IDC) за подібністю форми, об'єму та властивостями для комплексів *SaFtsZ*-білку з похідними 2,6-дифторбензаміду. Кишені IDC-сайту експериментальних комплексів оцінювали за допомогою методу «point-cloud» моделей за технологією Catalophore™. На підставі подібності було ідентифіковано чотири типи конформацій кишень сайту IDC, що виникають як результат білок-лігандного припасування: «1», «2», «3» і «2/3»

дуктом зантрину Z11 (Bryan et al, 2023). Автори відзначили, що флюоресцентний фрагмент цього ліганду не взаємодіє з FtsZ-білком, хоча результати нашого аналізу свідчать про можливість деяких поверхневих гідрофобних взаємодій. Форма та властивості каталофорної моделі для Z11 та DVX були подібними, що загалом, добре співвідноситься з вже відомими висновками (Bryan et al, 2023).

Для Z19 (3-[(6-етиніл-[1,3]тіазоло[5,4-b]піридин-2-іл)метокси]-2,6-біс(флюораніл)бензамід) було визначено проміжний тип кишені, який був близьким до інших зантринів (група 3), але за формою був схожий на групу «2» (рис. 3, «2/3»). Очевидно, це пов'язано з відсутністю трифторметильної групи на кінці «R-». З іншого боку, ймовірно, саме від цієї групи залежить специфічна конформація більшості зантринів. Так, виявлено алкілгідрофобну взаємодію трифторметильних груп Z11, Z16 та Z17 з Met218 та Ile311, а також галогенний зв'язок з Gly193. Для Z19 такі взаємодії відсутні, що також впливає на властивості «point-cloud» моделі IDC-сайту з Z19 (відсутність негативно зарядженої ділянки з боку спіралі H7). Загалом, у цьому випадку були відмічені інші унікальні особливості для структури 8HTB, що дає нам підстави виділити цю кишеню сайту в окремий тип «2/3».

Результати аналізу сайту міждоменної щілини, також відомого як сайт алостеричної регуляції, демонструють яскравий приклад конформаційної адаптації кишені сайту за об'ємом та формою до структур лігандів. Навіть така невелика група PDB-комплексів похідних 2,6-дифторбензамідів зі спільною молекулярною мішенню (*SaFtsZ*) характеризується формуванням чотирьох унікальних форм кишені цільового сайту. Контрольний докінг в програмі CCDC GOLD із застосуванням окремих білків або окремих груп мішеней (з груп «1», «2», «3» і «2/3»), не виявив жодного випадку вдалого докінгу для повної групи контрольних лігандів, залучених у дослідження. Слід зазначити, що така вибірковість виявлялася навіть тоді, коли нами використовувались протоколи докінгу з максимальним рівнем гнучкості лігандів. При цьому, успішне стикування всієї контрольної групи відбувалося лише при використанні ансамблю мішеней, що охоплю-

вав всі зазначені групи («1», «2», «3» і «2/3»). Отже, у разі віртуального скринінгу бібліотек лігандів можна рекомендувати використовувати ансамбль мішеней, який максимально розкриває конформаційну гнучкість сайту IDC. Безсумнівно, це значно збільшить охоплення кандидатів у IDC-інгібітори під час скринінгу хімічного простору. Слід зауважити, що дане дослідження ґрунтувалося виключно на комплексах з групою похідних 2,6-дифторбензаміду, а отже, конформаційна гнучкість і адаптаційний потенціал сайту IDC були виявлені лише частково. Безсумнівно, конформаційна гнучкість кишені сайту IDC, повинна стати об'єктом подальших досліджень, у міру того, як будуть відкриватись нові ефектори сайту, що належать до інших класів сполук.

Дослідження з молекулярного докінгу було виконано за допомогою програмного забезпечення CCDC GOLD, люб'язно наданого Кембриджським центром кристалографічних даних (CCDC) у рамках гранту Міжнародної програми Френка Аллена для підтримки досліджень і освіти (Frank Allen International Research and Education Program, FAIRE) – ID: 21554.

Дотримання етичних стандартів. Стаття не містить жодних досліджень, які були виконані з використанням лабораторних препаратів, клітинних ліній або інтактних організмів тварин чи людини.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність будь-якого конфлікту інтересів.

Фінансування. Робота виконана в рамках бюджетної теми Національної академії наук України (номер державної реєстрації 0120U100937, 2020-24).

LIGAND-INDUCED VARIABILITY OF THE FtsZ PROTEIN INTERDOMAIN CLEFT SITE POCKET

*D.S. Ozheriedov, S.P. Ozheredov,
O.M. Demchuk, Ya.B. Blume, P.A. Karpov*

Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine, Baidy-Vyshnevetskoho str., 2A, Kyiv, 04123, Ukraine

E-mail: karpov@nas.gov.ua; karpov@ifbg.org.ua

It was studied the variability of the allosteric binding site pocket located in the interdomain cleft (IDC) of FtsZ proteins. The point-cloud models of the IDC site pockets were constructed based on 11 structures for the *S. aureus* complexes of FtsZ protein with 2,6-difluorobenzamides:

OLQ, 9PC, OM8, OMW ZI1, ZI6, ZI7 and ZI9, which is currently deposited in the RCSB Protein Data Bank. Significant variability in volume and shape of the IDC site pocket, formed under adaptation to the ligand, was demonstrated. Four main conformational states of the site pocket, resulting from ligand-protein fitting were selected. It indicates that the docking of the ligands into the IDC site of individual 3D-models of FtsZ protein molecules is not effective. It was concluded that virtual screening efficiency can be significantly improved by use of an ensemble of molecular targets considering conformational variability of the IDC site pocket of bacterial FtsZ protein.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Addinall SG, Bi E, Lutkenhaus J (1996) FtsZ ring formation in fts mutants. *J Bacteriol* 178(13):3877–3884. <https://doi.org/10.1128/jb.178.13.3877-3884.1996>
- Andreu JM, Schaffner-Barbero C, Huecas S (2010) The antibacterial cell division inhibitor PC190723 is an FtsZ polymer-stabilizing agent that induces filament assembly and condensation. *J Biol Chem* 285(19):14239–14246. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.094722>
- Artola M, Ruíz-Avila LB, Ramírez-Aportela E et al (2017) The structural assembly switch of cell division protein FtsZ probed with fluorescent allosteric inhibitors. *Chem Sci* 8(2):1525–1534. <https://doi.org/10.1039/c6sc03792e>
- Ballante F (2021) Protein-ligand interactions and drug design. *Methods in Molecular Biology*. Humana, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1209-5>
- Bi EF, Lutkenhaus J (1991) FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* 354(6349):161–164. <https://doi.org/10.1038/354161a0>
- Bryan E, Ferrer-González E, Sagong HY et al (2023) Structural and antibacterial characterization of a new benzamide FtsZ inhibitor with superior bactericidal activity and *in vivo* efficacy against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *ACS Chem Biol* 18(3):629–642. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.2c00934>
- Casiraghi A, Suigo L, Valoti E et al (2020) Targeting bacterial cell division: A binding site-centered approach to the most promising inhibitors of the essential protein FtsZ. *Antibiotics* 9(2):69. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020069>
- Cramer P (2021) AlphaFold2 and the future of structural biology. *Nat Struct Mol Biol* 28(9):704–705. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00650-1>
- Demchuk O, Karpov P, Raspor P, Blume Ya (2011) Molecular modelling of FtsZ proteins based on their homology in *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* as the key stage of rational design of new antituberculous compounds. *Acta Biol Slovenica* 54(2):13–29. <https://doi.org/10.14720/abs.54.2.15476>
- Di Cera E (2020) Mechanisms of ligand binding. *Biophys Rev* 1(1):011303. <https://doi.org/10.1063/5.0020997>
- Elsen NL, Lu J, Parthasarathy G et al (2012) Mechanism of action of the cell-division inhibitor PC190723: modulation of FtsZ assembly cooperativity. *J Am Chem Soc* 134(30):12342–12345. <https://doi.org/10.1021/ja303564a>
- Ferrer-González E, Fujita J, Yoshizawa T et al (2019) Structure-guided design of a fluorescent probe for the visualization of FtsZ in clinically important gram-positive and gram-negative bacterial pathogens. *Sci Rep* 9(1):20092. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56557-x>
- Fujita J, Maeda Y, Mizohata E et al (2017) Structural flexibility of an inhibitor overcomes drug resistance mutations in *Staphylococcus aureus* FtsZ. *ACS Chem Biol* 12(7):1947–1955. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00323>
- Haeusser DP, Schwartz RL, Smith AM et al (2004) EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. *Mol Microbiol* 52(3):801–814. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04016.x>
- Hale CA, de Boer PA (1997) Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. *Cell* 88:175–185. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81838-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81838-3)
- Hendlich M, Rippmann F, Barnickel (1997) LIGSITE: automatic and efficient detection of potential small molecule-binding sites in proteins. *J Mol Graph Model* 15(6):359–369. [https://doi.org/10.1016/s1093-3263\(98\)00002-3](https://doi.org/10.1016/s1093-3263(98)00002-3)
- Huecas S, Araújo-Bazán L, Ruiz FM et al (2021) Targeting the FtsZ allosteric binding site with a novel fluorescence polarization screen, cytological and structural approaches for antibacterial discovery. *J Med Chem* 64(9):5730–5745. <https://doi.org/10.1021/acscimedchem.0c02207>
- Jones G, Willett P, Glen RC et al (1997) Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* 26(3):727–748. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>
- Jumper J, Evans R, Pritzel A et al (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596(7873):583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Karpov PA, Demchuk OM, Britsun VM, Lytvyn DI, Pydiura MO, Rayevsky O, et al (2016) New imidazole inhibitors of Mycobacterial FtsZ: the way from high-throughput molecular screening in Grid up to *in vitro*

- verification. *Sci Innovation* 12(3):44–59. <https://doi.org/10.15407/scin12.03.044>
- Matsui T, Yamane J, Mogi N et al (2012) Structural reorganization of the bacterial cell-division protein FtsZ from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68(Pt 9) 1175–1188. <https://doi.org/10.1107/S0907444912022640>
- Miguel A, Hsin J, Liu T (2015) Variations in the binding pocket of an inhibitor of the bacterial division protein FtsZ across genotypes and species. *PLoS Comput Biol* 11(3) e1004117. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004117>
- Pichoff, Lutkenhaus J (2002) Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J* 21(4):685693. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.4.685>
- Pradhan P, Margolin W, Beuria TK (2021) Targeting the achilles heel of FtsZ: the interdomain cleft. *Front Microbiol* 12:732796. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.732796>
- Sogawa H, Tomioka S, Shinzato T (2020) Binding sites of Zantrin inhibitors to the bacterial cell division protein FtsZ: molecular docking and ab initio molecular orbital calculations. *Chem Physics* 530:110603. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2019.110603>
- Stank A, Kokh DB, Fuller JC et al (2016) Protein binding pocket dynamics. *Acc Chem Res* 49(5): 809–815. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00516>
- Steinkellner G, Rader R, Thallinger GG (2009) VASCO: computation and visualization of annotated protein surface contacts. *BMC Bioinformatics* 10:32. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-32>
- Sun N, Du RL, Zheng YY (2018) Antibacterial activity of 3-methylbenzo[d]thiazol-methylquinolinium derivatives and study of their action mechanism. *J Enzyme Inhib Med Chem* 33(1):879–889. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1465055>
- Tan CM, Therien AG, Lu J, Lee SH et al (2012) Restoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility to β -lactam antibiotics. *Sci Transl Med* 4(126):126ra35. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003592>
- Trusca D, Scott S, Thompson C, Bramhill D (1998) Bacterial SOS checkpoint protein Sula inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein. *J Bacteriol* 180(15):3946–3953. <https://doi.org/10.1128/JB.180.15.3946-3953.1998>
- UniProt Consortium (2023) UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res* 51(D1):D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- Wagstaff JM, Tsim M, Oliva MA et al (2017) A polymerization-associated structural switch in FtsZ that enables treadmilling of model filaments. *MBio* 8(3): e00254–17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00254-17>
- Wang M, Fang C, Ma B et al (2020) Regulation of cytokinesis: FtsZ and its accessory proteins. *Curr Genet* 66(1):43–49. <https://doi.org/10.1128/mBio.00254-1> 10.1007/s00294-019-01005-6
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S et al (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 46(W1):W26–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Yamamoto S, Saito R, Nakamura S, Sogawa H, Karpov P et al (2020) Proposal of potent inhibitors for a bacterial cell division protein FtsZ: molecular simulations based on molecular docking and ab initio molecular orbital calculations. *Antibiotics (Basel)* 9(12):846. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120846>
- Zhou X, Zheng W, Li Y et al (2022) I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 17(10):2326–2353. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00728-0>

Надійшла в редакцію 11.02.2024
Після доопрацювання 26.03.2024
Прийнята до друку 18.07.2024