

УДК 577.3, 573.7

<https://www.doi.org/10.47813/nto.5.2024.1002>

EDN [SJQYOZ](#)

Суперкомпьютерное моделирование в задачах бактериальной антибиотикоустойчивости

К.Б. Терешкина^{1*}, Э.В. Терешкин¹, В.В. Коваленко¹, Ю.Ф. Крупянский¹, Н.Г. Лойко²

¹Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семенова Российской академии наук, ул. Косыгина, 4, Москва, 119991, Россия

²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Ленинский проспект, 33, стр. 2, Москва, 119071, Россия

*E-mail: quebra-mola@yandex.ru

Аннотация. В данной работе исследуются молекулярные механизмы взаимодействия антибиотика ципрофлоксацина с основным белком стационарной фазы развития бактериальной культуры (Dps, DNA-binding protein from starved cells) для решения задач возрастающей антибиотикоустойчивости. Неблагоприятные условия окружающей среды приводят к торможению процессов деления бактериальных клеток и переводят клетки в состояния сохранения внутренних ресурсов. Основной задачей для выживания бактерии в сложных внешних условиях является сохранение геномной ДНК. Защита ДНК при ряде стрессов (стресс голодания, окислительный стресс и др.) осуществляется путём её конденсации ДНК-связывающим белком Dps. В экспоненциальной фазе содержание этого белка 60 молекул на клетку, в стационарной фазе около 200 молекул на клетку. В работе рассмотрено влияние антибиотика ципрофлоксацина на этот белок. Используются методы современного молекулярного моделирования: докинг, зонтичная выборка (с нахождением потенциала средней силы), управляемая и классическая молекулярная динамика. Найдены энергетические характеристики связывания антибиотика с белком. Показано пространственное распределение молекул ципрофлоксацина в растворе относительно белка при температурах 28 и 55°C. Обнаружено, что антибиотик может мигрировать внутрь молекул белка.

Ключевые слова: суперкомпьютерное моделирование, бактериальная антибиотикоустойчивость, ципрофлоксацин, ДНК-связывающий белок Dps.

Supercomputer modeling in the problems of bacterial antibiotic resistance

K.B. Tereshkina^{1,*}, E.V. Tereshkin¹, V.V. Kovalenko¹, Y.F. Krupyanski¹, N.G. Loiko²

¹ Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 4 Kosygina st., Moscow, 119991, Russia

² Federal Research Centre 'Fundamentals of Biotechnology' of the Russian Academy of Sciences, 33 b. 2 Leninsky av., 119071 Moscow, Russia

*E-mail: quebra-mola@yandex.ru

Abstract. In this paper, the molecular mechanisms of interaction between the antibiotic ciprofloxacin and the main protein of the stationary phase of bacterial culture development (Dps, DNA-binding protein from starved cells) studied to solve problems of increasing antibiotic resistance. Unfavorable environmental conditions lead to inhibition of bacterial cell division and transfer cells to the states of internal resource conservation. The main task for the survival of bacteria in difficult external conditions is the preservation of DNA. DNA protection under a number of stresses (starvation, oxidative, etc.) is carried out by its condensation by the DNA-binding protein Dps. In the exponential phase, the content of Dps is 60, in the stationary phase ~200 molecules per cell. The paper considers the effect of the antibiotic ciprofloxacin on this protein. The methods of modern molecular modeling were used: docking, umbrella sampling, molecular dynamics. The energy characteristics of antibiotic binding to the protein were found. The spatial distribution of small molecules relative to the protein at 28°C and 55°C was shown. It was found that the antibiotic can migrate into the protein molecules.

Keywords: supercomputer modeling, bacterial antibiotic resistance, ciprofloxacin, DNA-binding protein Dps.

1. Введение

В последнее время всё более остро встаёт проблема возрастающей антибиотикоустойчивости бактерий. Это создаёт экологические проблемы и связанные с ними медицинские проблемы. Одним из механизмов защиты бактериальных клеток от неблагоприятных условий окружающей среды является их переход в покоящееся состояние. Происходящий при стрессах переход сопровождается значительным снижением чувствительности бактерий к антибиотикам, антисептикам, дезинфектантам и консервантам, что создаёт существенные проблемы в области антибактериальных мероприятий для экологии, медицины, и производств, где требуется соблюдение условий стерильности [1].

Для сохранения своей популяции, бактериальные клетки адаптировали ряд стратегий, которые направлены в первую очередь на сохранение целостности генетического материала [2]. Важную роль в сохранении генетического материала бактерий в таких состояниях играют ферритиноподобные ДНК-связывающие белки Dps и их гомологи [3]. Нуклеоид бактерий иерархически организован ДНК-связывающими белками [4]. Ими же обеспечивается защита генетического материала бактерий при любом стрессе на протяжении всего жизненного цикла бактериальной культуры. Бактериальная хромосома может образовывать различные конденсированные структуры при стрессе и становится нечувствительной к внешним воздействиям [5–8].

Белки Dps обладают двумя функциями важными для бактериальных клеток функциями. Во-первых, у всех бактерий они секвестрируют опасные формы двухвалентного железа Fe^{2+} , которые, без удаления из цитоплазмы, образуют путём реакции Фентона ядовитые формы кислорода. Накапливаемые внутри белка Dps ионы железа переводятся, минуя реакцию Фентона, в форму Fe^{3+} , связанную с белком. Второй функцией белков Dps является у многих бактерий является связывание и конденсация бактериальной ДНК в такой форме, которая противостоит подавляющему большинству внешних воздействий. Последняя из этих функций помогает прокариотическим клеткам не только пережить длительное голодание, но и стать более устойчивыми к любым стрессовым воздействиям, включая действие антимикробных агентов. [9]. Наличие такого белка у возбудителей *Yersinia pestis*, *Micobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* и других болезнетворных бактерий считается одним из

факторов, обеспечивающих их устойчивость к антибиотикам, и представляет несомненную экологическую и медицинскую проблему [10].

2. Постановка задачи (Цель исследования)

Несмотря на широкое изучение белка Dps различными методами при разных условиях, до сих пор отсутствует информация о молекулярных механизмах его взаимодействия с антибиотиками, в частности, доступным и широко применяемым антибиотиком цiproфлоксацином (рисунок, 1). Не понятно, может ли белок Dps (рисунок, 2) удалять антибиотик из цитоплазмы. Насколько воздействие антибиотика может быть критичным при образовании связей между подвижными N-концами белка и ДНК. Кроме того, не исследована область воздействия антибиотиков на начальных этапах образования комплексов ДНК-Dps. Поэтому целью данной работы было исследование молекулярных механизмов взаимодействия цiproфлоксацина с белком Dps и определение возможного влияния на образование комплексов с ДНК. В дальнейшем полученные результаты позволят провести необходимые экспериментальные исследования и помогут в разработке доступных и эффективных мер антибактериальной борьбы.

3. Методы и материалы исследования

В качестве методов исследования были выбраны три современных метода молекулярного моделирования. Докинг – один из высокопроизводительных методов поиска сайтов связывания лигандов (часто – лекарственных препаратов) с белком. Метод молекулярной динамики – ёмкий инструмент исследования эволюции межмолекулярных взаимодействий на атомном уровне. Методы поиска свободной энергии в молекулярной динамике позволяют определить энергетические характеристики связывания исследуемых веществ. Метод зонтичной выборки выигрывает в том, что позволяет построить зависимость потенциала средней силы от координаты, определив энергии на всё протяжении молекулярной траектории относительно заданной координаты.

Докинг цiproфлоксацина по всей поверхности белка проводился с использованием AutoDock и AutoDock Vina с генетическим алгоритмом Ламарка в пакете PyRx [9]. Заряды белка и лиганда назначались с использованием AutoDock Vina.

Расчёты молекулярной динамики проводились в полноатомном приближении с использованием программного комплекса Gromacs [10]. Применялись периодические граничные условия. Давление 1 атм. поддерживал Баростат Парринелло–Рамана (постоянная времени 2 пс) изотропным способом. Взаимодействия для связанных ковалентной связью и близких друг к другу атомов рассчитывались на каждом временном шаге. Учёт электростатических взаимодействий на больших расстояниях проводился по методу Эвальда (PME). Радиусы обрезания для всех типов взаимодействия брались равными 1.5 нм. Список соседей поддерживался с помощью схемы отсечки Верле и обновлялся каждые 10 фс. С помощью алгоритма LINCS ограничивались быстрые степени свободы. Шаг интегрирования был взят равным 2фс, длина траекторий составляла 0.5 мкс. Исследование велось при температурах 28°C и 55°C, поддерживаемых стохастическим методом (термостат Ланжевена).

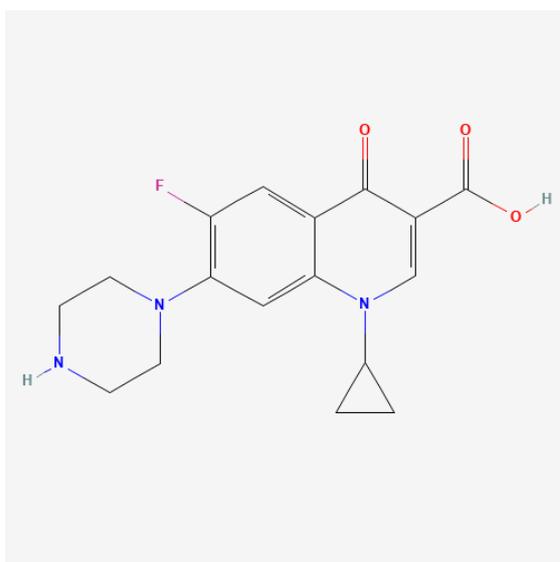


Рисунок 1. Структура антибиотика ципрофлоксацина.

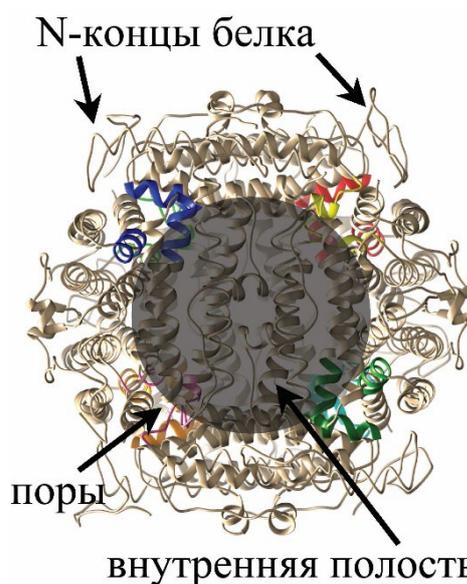


Рисунок 2. Структура ДНК-связывающего белка Dps (додекамерная форма). Цветами выделены поры.

Методы управляемой молекулярной динамики использовались для «протаскивания» молекулы ципрофлоксацина относительно координаты реакции через поры внутрь белка. После чего выбирались 200 точек вдоль координаты таким образом, чтобы

исследовать возможное проникновение антибиотика внутрь белка через поры Dps-типа и ферритинового типа.

4. Полученные результаты

Докинг молекул ципрофлоксацина проводился для всего белка, а также отдельных его областей (для охвата всей внешней и внутренней поверхности белка). В таблице 1 показано, что антибиотик обладает средней аффинностью связывания с белком. Основными сайтами связывания на поверхности белка являются ферритиновые поры белка, внутренняя поверхность белка, а также области N-концов.

Таблица 1. Свободная энергия взаимодействия ципрофлоксацина с областями белка Dps по данным докинга.

Положения в белке	Свободная энергия, ккал/моль
ферритиновые поры	-6.925
внутренняя поверхность белка	-6.675
N-концы	-6.701

Таким образом, докинг показывает, что антибиотик может связываться как с внешней, так и с внутренней поверхностью белка, но не даёт ответа и направлении процесса миграции малых молекул внутрь полости белка. Кроме того, докинг не может дать ответ на вопрос о свободной энергии лиганда при его нахождении в водном окружении вблизи внешней и внутренней поверхности. Для ответа на этот вопрос проведены исследования методом управляемой молекулярной динамики, зонтичной выборки с построением потенциала средней силы.

Проведённые молекулярно-динамические исследования показывают совпадение энергетических характеристик связывания ципрофлоксацина в районе ферритиновых пор и внутренней поверхности белка. Показано, что антибиотик способен проникать внутрь ферритиновых пор, но не может проникнуть в поры Dps-типа. Кроме того, расчёты в водном окружении показывают значительное отличие энергетических характеристик при нахождении антибиотика внутри и снаружи белка. По данным зонтичной выборки положение внутри белка энергетически более выгодно.

Таблица 2. Свободная энергия взаимодействия ципрофлоксацина с областями белка Dps по данным зонтичной выборки.

Положения в белке	Свободная энергия, ккал/моль
водное окружение вблизи внешней поверхности белка	~5
ферритиновые поры	~-7
водное окружение внутри белка	-10÷-12
внутренняя поверхность белка	~-7

Временная эволюция графиков функций радиального распределения (RDF) молекул ципрофлоксацина относительно белка Dps (рисунок, 3, 4) показывает наличие широкого пика при 28°C, что свидетельствует о том, что на поверхности белка адсорбированы как одиночные молекулы (~1.4 нм), так и кластеры ципрофлоксацина (~2.2 нм). В процессе динамики при 28°C на поверхности белка адсорбируются сначала одиночные молекулы, затем – кластеры. При 55°C ситуация иная. В этом случае одиночные молекулы собираются в кластеры ещё в растворе и только потом адсорбируются на поверхности белка. Об этом свидетельствует более гладкий пик на расстоянии примерно 2 нм. В целом, адсорбция на поверхности белка при более высокой температуре происходит быстрее, что видно по кривым 50-100нс.

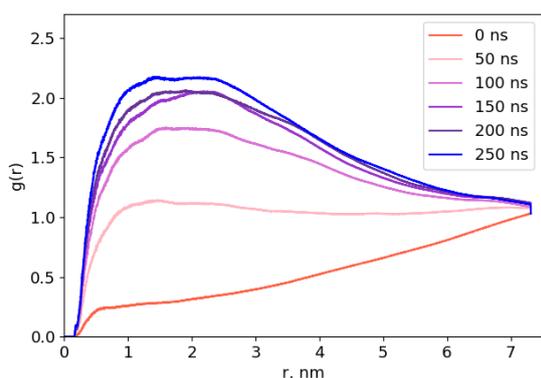


Рисунок 3. RDF Dps-антибиотик, 28°C.

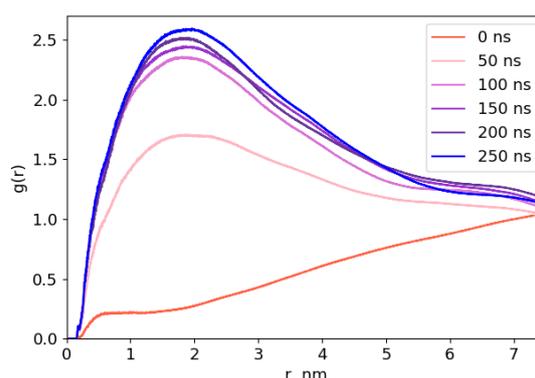


Рисунок 4. RDF Dps-антибиотик, 55°C.

5. Выводы

Методами современного суперкомпьютерного молекулярного моделирования показано, что антибиотик ципрофлоксацин может адсорбироваться на поверхности белка Dps, оказывая влияние на подвижность его N-концов и изменяя механизм связывания с ДНК. Исследование докинга и изменения свободной энергии взаимодействия (потенциал средней силы) ципрофлоксацина с Dps показывает, что антибиотик может проникать внутрь белка через ферритиновую пору и накапливаться во внутренней полости. Это даёт возможность предположить, что при диссоциации додекамера белка Dps, происходящем при изменении фазы роста бактериальной культуры, ципрофлоксацин может выходить в цитоплазму и оказывать влияние на клетку. Эффекты влияния антибиотика на белок Dps заметнее при повышении температуры с 28°C до 55°C.

Благодарности

Расчеты проводились на высокопроизводительной вычислительной системе МВС-10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре Российской академии наук (МСЦ РАН). Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-24-00250.

Список литературы

1. Windels E.M. Bacteria under antibiotic attack: Different strategies for evolutionary adaptation. / E.M. Windels, B. Van den Bergh, J. Michiels // PLoS Pathog. – 2020. – V. 16. № 5 – P. e1008431. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008431>
2. Ткаченко А.Г. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов / Ткаченко А.Г. – Екатеринбург: УрО РАН, 2012. – 267 с.
3. Orban K. Dps Is a Universally Conserved Dual-Action DNA-Binding and Ferritin Protein. / K. Orban, S.E. Finkel // J Bacteriol. – 2022 – V. 204 – P. e0003622. <https://doi.org/10.1128/jb.00036-2>.
4. Amemiya H.M. Nucleoid-associated proteins shape chromatin structure and transcriptional regulation across the bacterial kingdom / H.M. Amemiya, J. Schroeder, P.L. Freddolino // Transcription. – 2021. – V. 12. – № 4. – P. 182-218. <https://doi.org/10.1080/21541264.2021.1973865>
5. Minsky, A. Stress, order and survival / A. Minsky, E. Shimoni, D. Frenkiel-Krispin // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2002. – V. 3. – № 1. – P. 50-60. <https://doi.org/10.1038/nrm700>

6. Loiko N. Morphological peculiarities of the DNA-protein complexes in starved *Escherichia coli* cells / N. Loiko, Y. Danilova, A. Moiseenko et al. // PLoS One. – 2020. – V. 15. – № 10. – P. e0231562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231562>
7. Крупянский Ю.Ф. Архитектура нуклеоида в покоящихся клетках *Escherichia coli* / Ю.Ф. Крупянский // Хим. физика. – 2021. – Т. 40. – № 3. – С. 60-79. <https://doi.org/10.31857/S0207401X21030079>
8. Крупянский Ю.Ф. Архитектура конденсированной днк в нуклеоиде бактерии *Escherichia coli* / Ю.Ф. Крупянский, В.В. Коваленко, Н.Г. Лойко и др. // Биофизика. – 2022. – Т. 67. – № 4. С. 638-651. <https://doi.org/10.31857/S0006302922040020>
9. Dallakyan S. Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. / S. Dallakyan, A.J. Olson // Methods Mol. Biol. – 2015 – V. 1263 – P. 243-250.
10. Abraham M.J. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers / M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, and E. Lindahl // SoftwareX. – 2015 – V. 1. – No. 2. – P. 19–25.