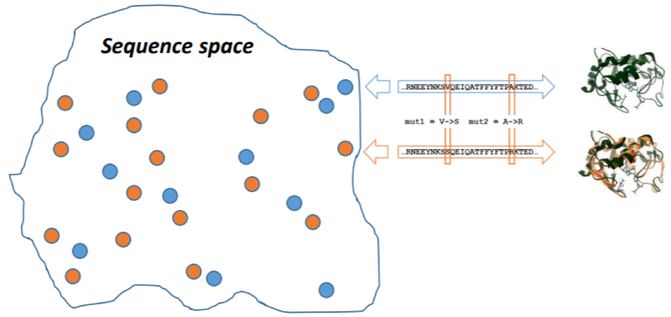
1

Эволюционный квест: как вирус убегает от лекарств

Петр Власов
Яков Боганцев
Софья Беляева
Дмитрий Коркин
Иванна Остапчук
Полина Авдюнина
Анжелика Додонова
Марлэн Токтомаматов
Алексей Ким
Anna Metreveli
Тимур Терехов
Ольга Кузьмич
Никита Радаев
Elizabeth Lesher
Егор Чудовский
Лина Мамешова

Среди антивирусных препаратов есть такие, чей механизм действия основан на прямом взаимодействии молекулы лекарства с молекулой белка-«мишени». Если взаимодействие лиганда и белка-мишени сильно, оно приводит к нежелательным - для жизненного цикла вируса - структурным изменениям. Благодаря многочисленным случайным мутациям возникают варианты последовательностей, которые сохраняют функциональность белков - но и локально меняют их структуру.



В целом, эволюцию белков можно представить как процесс «блуждания» в невообразимо огромном «пространстве вариантов». Каждая точка в этом пространстве соответствует некоторой белковой последовательности, а переходы между точками соответствуют эволюционным событиям (мутациям). Вопросы о том, каково соотношение «хороших» и «плохих» вариантов, насколько трудно эволюционному процессу «найти» новое подходящее состояние, и как в целом устроено это пространство - остаются открытыми для науки.

Мы хотим изучить «пространство вариантов» для некоторых конкретных вирусных белков - и для этого совместить подходы из двух областей биологии: структурной и эволюционной

цель №1:

Смоделировать большое количество вариантов белков и предсказать, какие их них будут хорошо, а какие плохо взаимодействовать с лекарственными препаратами

это «структурная» часть проекта

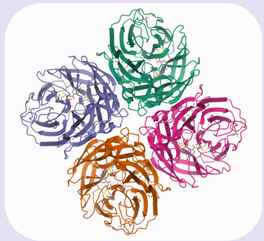
цель №2:

Изучить распределение вариантов в «пространстве» и понять, какие переходы между «плохими» и «хорошими» вариантами возможны + насколько сложно устроены «маршруты», по которым вирусы «убегают» от действия лекарств

это «эволюционная» часть проекта

Материалы и методы

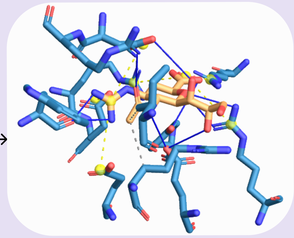
RCSB PDB PROTEIN DATA BANK



комплекс нейраминидазы с Осельтамивиром - 2hu4

PDB - база данных структур белков и белковых комплексов. Мы использовали ее для поиска аннотированных структур белков.

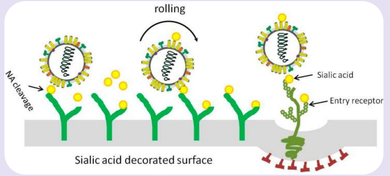
Protein-Ligand Interaction Profiler



комплекс нейраминидазы с Занамивиром - 4b7q

В базе данных PLIP мы искали комплексы белков с малыми молекулами для определения сайта связывания. Эту информацию мы использовали в дальнейшем для генерации мутантов и докинга.

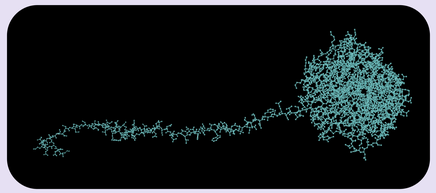
Таргетный белок



Вирусная нейраминидаза расщепляет сиаловые кислоты непосредственно от места прикрепления. Возникший в результате этого градиент концентрации сиаловых кислот продвигает вирус по поверхности клетки до тех пор, пока он успешно не заразит клетку-хозяина.

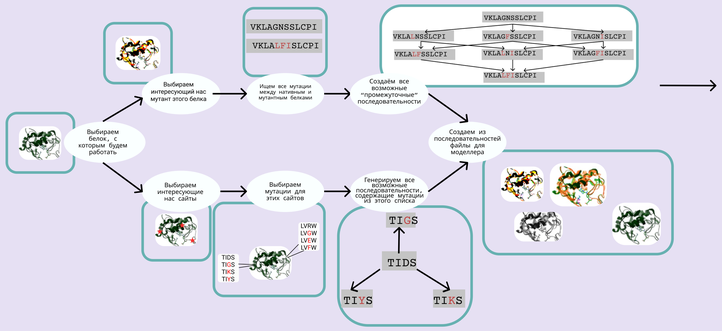
Противовирусные препараты блокируют активный сайт вирусной нейраминидазы, что позволяет сохранить остатки сиаловой кислоты на поверхности клеток хозяина и предотвратить заражение клетки-хозяина.

UCSF Chimera/PyMol



Инструменты для визуализации белков. Необходимы для сопоставления структур исходных белков и белков-мутантов.

Пайплайн массовой генерации множества мутантов



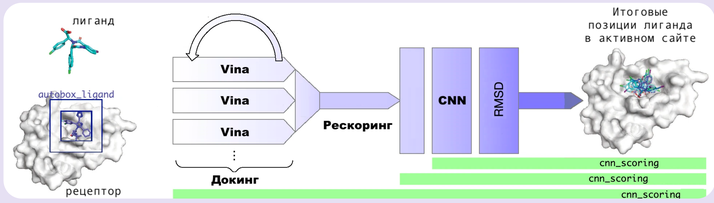
Modeller

Program for Comparative Protein Structure Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints

```
>1 1 117V

MNPNQKIITIGSVCMTIGMANLILQIGNIISIWISHSIQLGNQNQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSV
VSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSKDNSVRIGSKGDVFVRREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSC
PIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDNGAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTV
MTDGPSNGQASYKIFRIEKGKIVKSVEMNAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSNRPWVSFNQNLEYQIGYICS
GIFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRNGFEMIWDPNGWTGTDNNFSIKQDIVGI
NEWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPKENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK

>25 3 117V 223R 427T

MNPNQKIITIGSVCMTIGMANLILQIGNIISIWISHSIQLGNQNQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSV
VSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSKDNSVRIGSKGDVFVRREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSC
PIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDNGAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNRLRTQESECACVNGSCFTV
MTDGPSNGQASYKIFRIEKGKIVKSVEMNAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSNRPWVSFNQNLEYQIGYICS
GIFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRNGFEMIWDPNGWTGTDNNFSIKQDIVGI
NEWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPKENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK
```

Компьютерная программа MODELLER использовалась для генерации мутантов и перевода последовательностей мутантных белков из формата "fasta" в формат "pdb".

Пайплайн массового докинга лигандов в белки

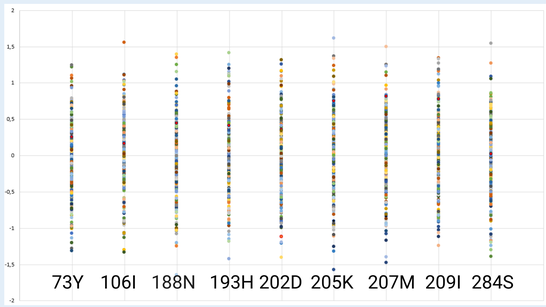


ZIMIN FOUNDATION

ШМТБ

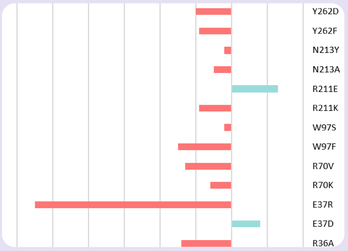
Петровакс

2 Анализ данных, результаты и обсуждение

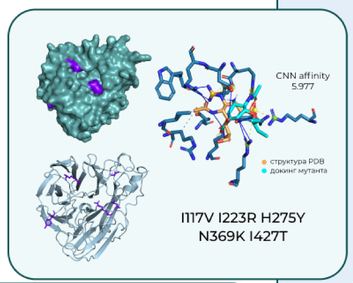


Примечательно, что любой мутант может иметь сильно разный (как положительный, так и отрицательный) эффект на энергию связывания в зависимости от контекста.

E37D	0,08
E37R	-0,55
R70K	-0,06
R70V	-0,13
W97F	-0,15
W97S	-0,02
R211K	-0,09
R211E	0,13
N213A	-0,05
N213Y	-0,02
Y262F	-0,09
Y262D	-0,1

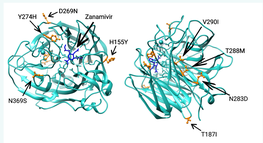


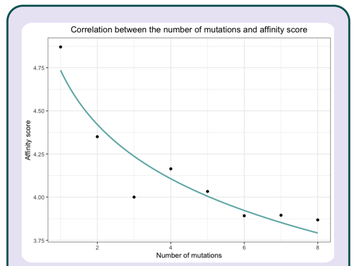
Примечательно, что наименьшая энергия связывания белка с лигандом оказалась у мутанта не с наибольшим количеством мутаций. 6 мутаций: 36K, 37R, 97S, 213Y, 262F, 286K. CNN affinity - 3.28.



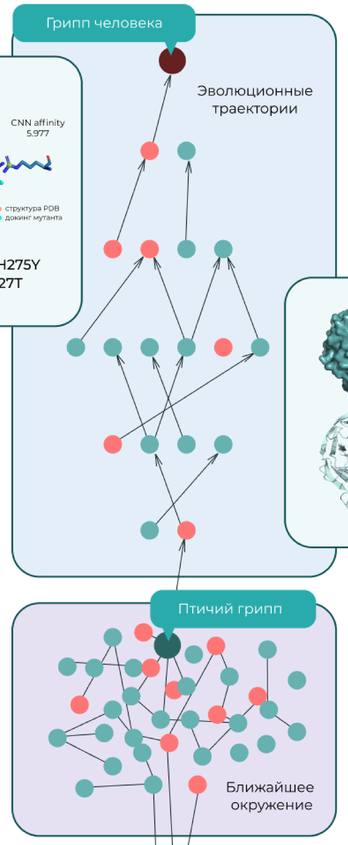
Примечательно, что даже при большом количестве мутаций с индивидуально-сильным эффектом изредка встречаются такие их комбинации, которые сохраняют высокий CNN affinity.

Связывание нейраминидазы вируса H1N1 человека с препаратом Занамивир (PDB ID 3CKZ). Мутированные области выделены оранжевым цветом, а метки указывают на дикий тип (the wild type) и мутированные остатки. Темно-синим цветом показан сам Занамивир.



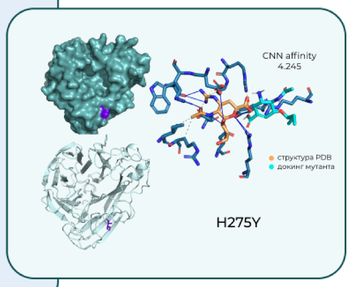


Энергия связывания очень быстро падает с каждой последующей мутацией.



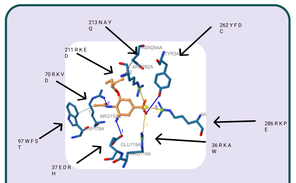
Выборка 1: потенциальные эволюционные траектории между птичьим гриппом H7N1 (GEN.Bank JQ973644.1) и человеческим гриппом H1N1 (PDB ID 3CKZ) (1). Смоделировано взаимодействие всех возможных мутантов на этих траекториях с лекарственным препаратом Занамивиром.

1. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01066/full

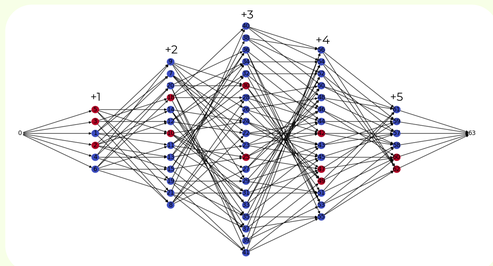


Спец-проект ‘Angry Birds’ посвящен изучению потенциального перехода нового штамма птичьего гриппа в человеческую популяцию. Изучалась возможность постепенного набора мутаций, приближающих последовательность и структуру нейраминидазы вируса птиц к нейраминидазе вируса, поражающего людей. Примечательно, что при небольшом количестве отличий от человека птичий вариант может быть резистентным к известным ингибиторам (лекарствам) нейраминидазы.

Выборка 2: ближайшее окружение белка. Нейраминидаза гриппа H1N1 человека (PDB ID 2HU4) была взята как дикий тип. Все 8 аминокислот в активном сайте либо оставались такими же, либо заменялись на схожую аминокислоту, либо заменялись на отличную аминокислоту. Все возможные мутанты были сгенерированы и смоделированы.



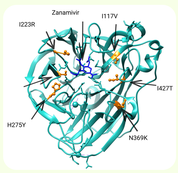
Визуализация сайта связывания нейраминидазы вируса гриппа (H1N1) с Осельтамивиром. Метки на аминокислотах обозначают номер остатка в последовательности полипептида, исходную аминокислоту и её три мутантных варианта. Один из мутантных вариантов близок к исходному по аминокислотному составу, а два других обладают противоположными химическими свойствами в сайте связывания.



Все возможные траектории между белком дикого типа и множественным мутантом, содержащим несколько единично-резистентных мутаций. Красные вершины - хорошо связывающиеся с лигандом мутанты, синие - плохо связывающиеся. Ребра соответствуют переходам из одного состояния в другое за одну аминокислотную мутацию.

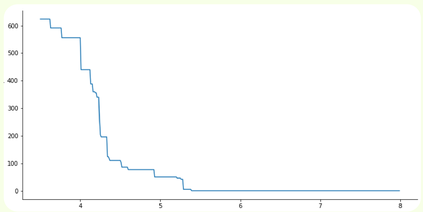
Выборка 3: резистентные варианты гриппа H1N1. Данные были взяты из публикаций о клинически подтверждённых штаммов (1, 2). В сумме использовалось 6 замен относительно дикого типа (PDB ID: 2HU4). Были сгенерированы все возможные соответствующие комбинации мутаций.

1. https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(11)70318-8/fulltext
2. https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0210119



Выше приведена визуализация взаимодействия белка нейраминидазы из вируса H1N1 с молекулой препарата Занамивир. Области, обозначенные оранжевым цветом, показывают мутированные аминокислотные остатки. Произведённые мутации обозначены на схеме. Метки обозначают аминокислоту в диком типе (wild type), позицию остатка и аминокислоту в белке-мутанте.

Количество “хороших” траекторий



Количество “хороших” (состоящих только из резистентных мутантов) траекторий как функция от порогового значения разделения мутантов на резистентные и не-резистентные. Примечательно, что в диапазоне между 4 и 5 CNN affinity наблюдается резкий спад возможности прохождения из начальной точки в конечную.

ZIMIN FOUNDATION ШМТБ Петровакс