

УДК: 577.322

## Молекулярные механизмы взаимодействия белков CtmB вируса оспы коров и вируса натуральной оспы с фактором некроза опухолей человека

Иванисенко Н.В.<sup>1\*</sup>, Трегубчак Т.В.<sup>2</sup>, Сайк О.В.<sup>1</sup>,  
Иванисенко В.А.<sup>1</sup>, Щелкунов С.Н.<sup>1,2</sup>, Колчанов Н.А.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение Российской академии наук, Новосибирск, Новосибирская область, 630090, Россия

<sup>2</sup>ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область, 630559 Россия

<sup>3</sup>Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Новосибирская область, 630090, Россия;

**Аннотация.** Рекомбинантные вирусные белки, блокирующие активность фактора некроза опухолей (ФНО), могут быть использованы для разработки новых препаратов, предназначенных для лечения воспалительных заболеваний. Компьютерное моделирование комплекса взаимодействующих белков и выявление закономерностей их взаимодействия обеспечивает возможность предсказания и создания методами направленного мутагенеза измененных форм ФНО-связывающих белков (ФНО-СБ) ортопоксвирусов, которые с наибольшей эффективностью способны связываться и нейтрализовать активность ФНО. Для анализа механизмов взаимодействия ФНО человека (чФНО) с ФНО-связывающими доменами ФНО-СБ вируса оспы коров (ФНОСД-ВОК) и ФНО-СБ вируса натуральной оспы (ФНОСД-ВНО) и определения наиболее важных аминокислот, участвующих в образовании комплексов, были использованы компьютерные модели, построенные на основе структуры комплекса мутантного чФНО с рецептором ФНО типа II (чФНОР-II), полученной методом рентгеноструктурного анализа. С использованием моделирования молекулярной динамики и метода расчета свободной энергии MM-GBSA было показано, что чФНО связывается с большей аффинностью с ФНОСД-ВНО по сравнению с ФНОСД-ВОК. Результаты расчетов были подтверждены данными экспериментов по измерению констант связывания изучаемых белков методом SPR. Выявлено, что аминокислотная замена в последовательности ФНО-СБ ВНО ASP63→ASN63 приводит к структурным перестройкам, благоприятствующим взаимодействию ФНО-СБ ВНО с ФНО человека. Дополнительно, протокол разложения свободной энергии по аминокислотным остаткам позволил выявить ключевые аминокислоты, участвующие в энергии образования комплексов.

**Ключевые слова:** моделирование молекулярной динамики, препараты антицитокинного действия, вирус натуральной оспы (ВНО), вирус оспы коров (ВОК), фактор некроза опухоли.

**Список сокращений:**

- чФНО – фактор некроза опухоли человека  
 чФНОР-II – человеческий рецептор ФНО типа II  
 ФНОСД – фактор некроза опухолей связывающий домен белка CrmB  
 ФНО-СБ – ФНО связывающий белок  
 ФНОСД-ВОК – фактор некроза опухолей связывающий домен белка CrmB вируса оспы коров  
 ФНОСД-ВНО – фактор некроза опухолей связывающий домен белка CrmB вируса натуральной оспы  
 ММ-PBSA – molecular mechanics/Poisson Boltzmann surface area  
 ММ-GBSA – molecular mechanics/Generalized Born surface area  
 ВНО – вирус натуральной оспы  
 ВОО – вирус оспы обезьян  
 ВОК – вирус оспы коров  
 МД – молекулярная динамика  
 SPR – Surface plasmon resonance

**ВВЕДЕНИЕ**

Ключевую роль в развитии воспалительного процесса играют провоспалительные цитокины, в частности ФНО, интерлейкины ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-8, интерфероны. Особое внимание уделяют провоспалительным свойствам ФНО, которые имеют ключевое значение в патогенезе многих воспалительных заболеваний. Гиперпродукция ФНО приводит к развитию хронических воспалительных заболеваний, в том числе аутоиммунной природы. В связи с этим ФНО рассматривается как основная мишень для разработки новых биомедицинских технологий лечения воспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, болезнь Крона и ряда других. В качестве подходов к антицитокиновой стратегии лечения этих заболеваний используют различные белковые ингибиторы ФНО на основе генно-инженерных продуктов, которые блокируют биологическую активность этого цитокина. В настоящее время разработан ряд ФНО-антагонистов, три из которых – инфликсимаб (Infliximab), этанерсепт (Etanercept) и адалимумаб (Adalimumab) – применяются в клинике для терапии воспалительных заболеваний.

Инфликсимаб – химерное моноклональное антитело к ФНО, содержащее человеческую константную часть и мышинный переменный район, он взаимодействует со свободным и мембраносвязанным ФНО с высокой аффинностью [1, 2].

Этанерсепт представляет собой рекомбинантный химерный белок, состоящий из двух внеклеточных цистеин-богатых субдоменов чФНОР-II, соединенных с Fc-фрагментом IgG1 человека [3].

Адалимумаб – полностью человеческое моноклональное антитело к ФНО, также связывающее свободный и мембраноассоциированный лиганд [4].

Хотя известные сегодня ингибиторы ФНО продемонстрировали относительно высокую эффективность в процессе контролируемых исследований терапии ревматоидного артрита [5, 6], в реальной клинической практике около 30–40% пациентов рефрактерны к терапии этими препаратами, менее чем у половины из них удается достигнуть полной или частичной ремиссии, а около 1/3 вынуждены прекращать лечение из-за развития вторичной неэффективности или побочных эффектов через 2–3 года терапии. Применение препаратов в ряде случаев ограничено при наличии у пациентов туберкулеза [7], латентных инфекций [8, 9]; причины и механизмы таких осложнений остаются невыясненными. Следовательно, существует необходимость создания препаратов нового типа, возможно более безопасных и

эффективно блокирующей активность ФНО.

В настоящее время рассматривается еще один подход – использование рекомбинантных вирусных белков, блокирующих активность ФНО. Известно, что ряд вирусов в ходе эволюции выработал специфические способы защиты от иммунной системы человека, заключающиеся в синтезе вирусных белков, которые могут эффективно вмешиваться в иммунорегуляцию, блокируя биологическую активность некоторых иммунорегуляторов. В частности, ортопоксвирусы продуцируют белки, блокирующие активность ФНО [10, 11]. Использование этих вирусных белков рассматривается как эффективный подход для разработки новых биомедицинских технологий защиты человека в качестве препаратов антицитокинового действия, которые по некоторым характеристикам имеют преимущества по сравнению с другими подходами, направленными на блокирование патогенетической роли ФНО при патологии [12].

Важное значение при этом имеет изучение возможности создания методами направленного мутагенеза измененных форм ФНО-связывающих белков ортопоксвирусов, которые с наибольшей эффективностью будут способны связываться и нейтрализовать активность ФНО. Решающее значение для таких исследований представляет моделирование комплекса взаимодействующих белков и выявление закономерностей их взаимодействия. Наиболее эффективным подходом для решения такой задачи являются компьютерное моделирование.

Компьютерные и теоретические методы широко используются при анализе физических механизмов образования белок-белковых комплексов и позволяют дополнить экспериментальные данные новой информацией о природе межмолекулярного взаимодействия [13–19]. Последнее время, всё большую популярность получили методы, позволяющие оценить свободную энергию образования молекулярных комплексов, с использованием непрерывного представления воды (ММ-PBSA и ММ-GBSA) [13–17, 20–22]. Использование метода ММ-GBSA совместно с молекулярной динамикой позволяет получить информацию о структурных и энергетических особенностях взаимодействия, выявить ключевые аминокислоты, участвующие в образовании комплекса, объяснить вклад отдельных мутаций на стабильность комплексов и т. д. [14–16]. Знание об аминокислотах, оказывающих наибольший вклад в энергию стабилизации комплексов («горячие участки»), важно при разработке потенциальных лекарственных препаратов, направленных на ингибирование процесса образования белок-белковых комплексов путем взаимодействия с «горячими участками».

Ранее выполненный нами компьютерный анализ аминокислотных последовательностей ФНО-связывающих белков СrmB вирусов натуральной оспы (ВНО), оспы обезьян (ВОО) и оспы коров (ВОК), патогенных для человека, выявил их высокую гомологию и наличие относительно небольших видоспецифичных аминокислотных различий [23–25]. Индивидуальные рекомбинантные белки ВНО-СrmB, ВОО-СrmB и ВОК-СrmB были синтезированы в бакуловирусной системе экспрессии. Было показано, что СrmB белки ВНО, ВОО и ВОК различаются по эффективности ингибирования цитотоксичного эффекта человеческого, мышинового и кроличьего ФНО в культуре клеток фибробластов мыши L929 [26].

Недавно было обнаружено, что СrmB является двухдоменным белком, у которого N-концевой домен обеспечивает связывание с ФНО, а С-концевой – взаимодействие с рядом хемокинов [27]. Нами показано, что удаление С-концевого хемокин-связывающего домена из белка ВНО-СrmB не влияет на его эффективность ингибирования ФНО-индуцированной цитотоксичности. Поэтому целью настоящей работы было компьютерное моделирование и сравнительное исследование механизмов молекулярных взаимодействий в белковых комплексах человеческого (ч) ФНО с N-

концевыми ФНО-связывающими доменами белка CtmB (ФНОСД) вирусов ВОК и ВНО.

Моделирование молекулярной динамики гомологичных комплексов чФНО с ФНОСД-ВОК и ФНОСД-ВНО с использованием метода расчета свободной энергии MM-GBSA позволило оценить свободные энергии образования комплексов. Предсказанные значения имели хорошее согласие с результатами экспериментального анализа аффинности образования комплексов (табл. 1). Дополнительно, с использованием протокола разложения свободной энергии мы провели анализ вклада отдельных аминокислот в стабильность исследуемых комплексов. Было обнаружено, что аминокислоты ASP135, TYR79, TYR107, ALA25 в последовательности чФНО, а так же аминокислоты ARG61, ARG48, LEU90, LEU56, LEU52 в последовательностях ФНОСД-ВОК и ФНОСД-ВНО являются ключевыми в стабилизации всех рассматриваемых комплексов. Результатом данной работы стало более глубокое понимание молекулярных механизмов взаимодействия ФНОСБ-ВНО и ФНОСБ-ВОК с ФНО. Полученные данные могут быть использованы для планирования экспериментов по сайт-специфичному мутагенезу с целью улучшения аффинности взаимодействия ФНО с ортопоксвирусными ФНОСД и создания на их основе потенциальных терапевтических препаратов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Моделирование по гомологии

Пространственные модели структур белков, используемых в работе, были автоматически сгенерированы программой SWISS-MODEL, используя структуру комплекса чФНОР-II с мутантным человеческим ФНО, полученную методом рентгеноструктурного анализа (pdbid:3ALQ).

Структурное подтверждение пространственных структур построенных моделей проводилось с использованием PROCHECK [28, 29].

### Моделирование молекулярной динамики и расчет свободной энергии связывания

Моделирование молекулярной динамики проводилось с использованием силового поля AMBER03 [30], реализованного в модуле «sander» пакета программ AMBER12 [31]. Структуры комплексов растворялись в кубическом боксе TIP3P с размерами граней не меньше 12 Å в каждую сторону, и расстоянием обрезания 12 Å для несвязанных взаимодействий. Моделирование проводилось с периодическими границами. Дальние электростатические взаимодействия учитывались, используя particle-mesh-Ewald метод. [32, 33]. Временной шаг составлял 2 фс. Траектория записывалась каждые 0.1 пс.

Энергетическая минимизация проводилась для каждого растворенного комплекса, с использованием сопряженного алгоритма минимизации [31]. Прикладывая гармонические ограничения с силовой константой 10 Å ко всем атомам растворенного объекта, канонический ансамбль (NVT)-MD был использован в течение 50 пс, при которых система нагревалась с 0 К до 300 К. Изотермальный изобарический ансамбль (NPT)-MD был использован в течение следующих 8 нс молекулярной динамики. Длины связей, включая связь с атомами водорода, были ограничены с помощью SHAKE алгоритма [34].

Для MM-GBSA и методологии разложения свободной энергии по остаткам, «снимки» траектории брались с интервалом 1 пс из соответствующих последних 4 нс МД траектории. Явные молекулы воды удалялись из траектории. Энергия рассчитывалась с использованием очень большого радиуса обрезания (999 Å). Свободная энергия взаимодействия  $\Delta G_{\text{bind}}$  рассчитывалась как

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{gas}} + \Delta G_{\text{solv}} - T\Delta S_{\text{conf}}, \quad (1)$$

где  $\Delta E_{\text{gas}}$  энергия взаимодействия между молекулами в газовой фазе и задается как

$$\Delta E_{\text{gas}} = \Delta E_{\text{el}} + \Delta E_{\text{vdw}}, \quad (2)$$

где в  $\Delta E_{\text{el}}$  и  $\Delta E_{\text{vdw}}$  включаются электростатическое и Ван-дер-ваальсовы взаимодействия, соответственно. Свободная энергия сольватации ( $\Delta G_{\text{solv}}$ ) рассчитывалась как сумма электростатической свободной энергии сольватации ( $\Delta G_{\text{GB}}$ ) и неполярного вклада в свободную энергию сольватации ( $\Delta G_{\text{NP}}$ ).  $\Delta G_{\text{NP}}$  рассчитывалась из доступной растворителю площади поверхности, как  $\Delta G_{\text{NP}} = \alpha S + \Delta$ ,  $S$  – площадь молекулярной поверхности, доступной для растворителя. Пробный радиус брался равным 0.14 нм при расчете молекулярной поверхности.

$\Delta G_{\text{GB}}$  и  $\Delta G_{\text{NP}}$  рассчитывались с использованием непрерывного растворителя с помощью модели ММ-GBSA, реализованной в ММ\_PBSA.py пакете программ AMBER 12.

При расчете суммарной свободной энергии вклад от конформационной энтропии  $T\Delta S_{\text{conf}}$  не учитывался из-за высоких компьютерных затрат и низкой точности предсказаний [35].

Разложение свободной энергии по аминокислотным остаткам проводилось с использованием протокола, реализованного в MMPBSA.py [36].

### SPR-анализ белок-белковых взаимодействий

Количественная оценка эффективности взаимодействия двух белков осуществлялась на оптическом биосенсоре ProteOn\_XPR36 Protein Interaction Array System (Bio-Rad Laboratories, Inc.), в основу метода детекции которого заложено явление поверхностно-плазмонного резонанса. Все эксперименты проводились при 25°C и скорости потока 30 мкл/мин. Рекомбинантные белки CrmB-ВНО и CrmB-ВОК были ковалентно иммобилизованы на чипе GLM. Чип активировался в течение 2 мин смесью 1-(3-диэтиламинопропил)-3-этилкарбодимид гидрохлорида (0.13 М) и N-гидроксисульфосукцинимидом (0.03 М). Далее иммобилизовались вирусные белки с концентрацией 50 мкг/мл в 10 мМ растворе ацетата натрия (рН 4.5) на поверхность чипа, после чего поверхность деактивировалась 1М этаноламин гидрохлоридом в течение 3 мин., иммобилизационный уровень составил 1000 RU. Измерения проводились в буфере PBS, содержащем 0.005 % Tween 20. В качестве ананта использовался чФНО («Invitrogen», США) в пяти различных концентрациях от 6.25 нМ до 100 нМ (со скоростью потока 30 мкл/мин). После каждого измерения поверхность регенерировалась 10 мМ глицин гидрохлоридом (рН 2.5). Для обработки данных была выбрана модель Ленгмюра 1:1. Измерения проводились на базе научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук (Москва).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Моделирование по гомологии

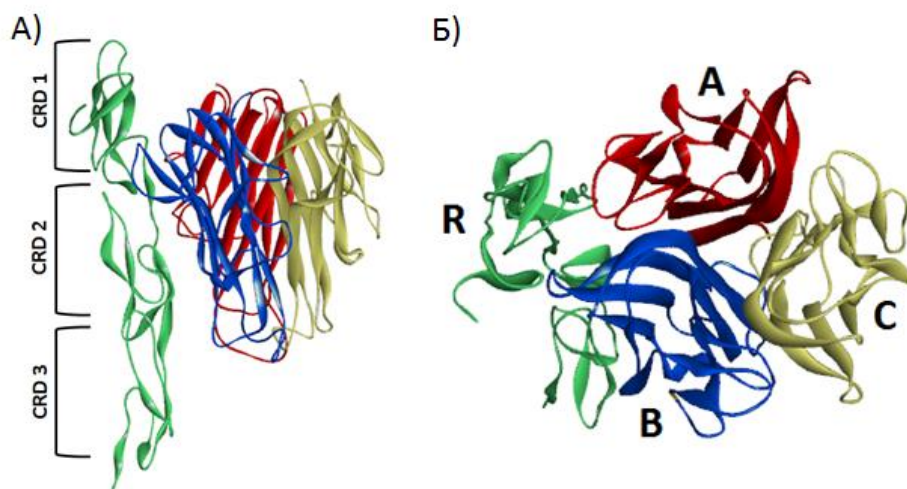
ФНОСД-ВОК	1	KCKDNEYNRHNLCCLSPPGTYASRLCDSKTNNTIQCTPCGSGFTSRNNHLPACLSCNG	60
ФНОСД-ВНО	1	KCKDTEYNRHNLCCLSPPGTYASRLCDSKTNNTIQCTPCGSGFTSRNNHLPACLSCNG	60
ФНОСД-ВОК	61	RCNSNQVETRSCNITHNRICECSPGYCYLLKGS S GCKACVSTKCGIGYGVSGHTS V GDV	120
ФНОСД-ВНО	61	RCNSNQVETRSCNITHNRICECSPGYCYLLKGS S GCKACVSTKCGIGYGVSGHTS V GDV	120
ФНОСД-ВОК	121	VCSPCGLGTYSHTVSSADKCEPVPRSHNNHHH	152
ФНОСД-ВНО	121	I CSPCGFGTYSHTVSSADKCEPVPRSHNNHHH	152

Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей ФНОСД-ВОК и ФНОСД-ВНО. Отличия по аминокислотным остаткам выделены желтым цветом.

Предсказание пространственных структур белков ФНОСД-ВНО, ФНОСД-ВОК, чФНО проводилось с использованием Swiss-model [37–39]. Для предсказания 3d структуры белков ФНОСД-ВНО и ФНОСД-ВОК в качестве шаблона была взята структура ФНОСД чФНОР-II (pdbid: 3ALQ), представленная в комплексе с мутантным чФНО. ФНОСД чФНОР-II обладает более 40% идентичности с каждым из рассмотренных вирусных ФНОСД, а также имеет сходное количество CRD доменов и дисульфидных связей, участвующих в их образовании [40]. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей ФНОСД-ВНО и ФНОСД-ВОК с чФНОР-II приведено на рис. 1.

Последовательности ФНОСД-ВОК и ФНОСД-ВНО отличаются между собой заменой 6 аминокислотных остатков и делецией 2-х остатков. В предсказанных структурах ФНОСД-ВНО, ФНОСД-ВОК отсутствовал начальный фрагмент, соответствующий аминокислотной последовательности MAPYTPPNGK и MAPHAPSNGK для ФНОСД-ВОК и ФНОСД-ВНО соответственно, не имеющий гомологии с ФНОСД чФНОР-II. Как показал анализ, приведенный ниже, данный фрагмент не находится в связывающем интерфейсе ФНОСД-ВОК, ФНОСД-ВНО белков и не рассматривался при моделировании взаимодействий этих белков с чФНО.

В качестве шаблона для предсказания пространственных структур чФНО использовался мутантный чФНО комплекса pdbId:3ALQ. В работе при нумерации аминокислотной последовательности чФНО положение аминокислоты чФНО SER85 (UNIPROT ID P01375) принималось за 1. Нумерация аминокислотной последовательности ФНОСД-ВНО проводилась согласно выравниванию последовательностей ФНОСД-ВОК и ФНОСД-ВНО (см. рис. 1).



**Рис. 2.** Предсказанная 3D структура комплекса гомотримера чФНО с одной молекулой ФНОСД-ВОК, представленная видом сбоку (А), видом сверху (Б). Квадратными скобками выделены CRD домены ФНОСД-ВОК. Цвета и буквы соответствуют различным субъединицам комплекса, (R – ФНОСД-ВОК; А, В, С – разные молекулы гомотримера чФНО). Использовано ленточное представление (Solid ribbon) белка.

Сборка комплексов чФНО/ФНОСД-ВОК и чФНО/ФНОСД-ВНО проводилась путём структурного выравнивания моделей предсказанных пространственных структур чФНО, ФНОСД-ВОК и ФНОСД-ВНО с экспериментальной 3D структурой комплекса мутантного чФНО/ФНОСД чФНОР-II (pdbid: 3ALQ). Более чем 90% всех аминокислотных остатков находились в предпочтительных местах диаграммы Рамахандрана, и общий G-factor для каждой из структур был близок к

экспериментальным структурам 3ALQ. Предсказанная структура комплекса чФНО/ФНОСД-ВОК показана на рис 2,А,Б.

### Свободные энергии связывания

В таблице 1 приведены вклады в свободную энергию связывания ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) для комплексов чФНО/ФНОСД-ВОК, чФНО/ФНОСД-ВНО, полученные с использованием метода ММ-GBSA для расчета свободной энергии. Они состоят из газовой составляющей энергии ( $\Delta E_{\text{gas}} = \Delta E_{\text{vdw}} + \Delta E_{\text{el}}$ ), включающей электростатические и ван-дер-ваальсовы взаимодействия между белками, сольватационной свободной энергии  $\Delta G_{\text{solv}}$ , включающей полярные ( $\Delta G_{\text{GB}}$ ) и неполярные ( $\Delta G_{\text{NP}}$ ) вклады.

Как можно видеть из рассчитанной суммарной свободной энергии взаимодействия ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) (табл. 1), чФНО связывается сильнее с ФНОСД-ВНО по сравнению с ФНОСД-ВОК, что согласуется с экспериментально полученными константами аффинности связывания  $KD_{\text{exp}}$ . Следует отметить, что полученные значения оценок свободных энергий связывания не отражают абсолютное значение свободной энергии взаимодействия, так как вклад от конформационной и трансляционной энтропии в энергию образования комплексов не учитывался из-за их высокой вычислительной стоимости и низкой точности предсказания.

Во всех рассматриваемых комплексах наблюдается стабилизирующее электростатическое взаимодействие между субъединицами. В растворе воды при образовании комплекса появляется дополнительный энергетический штраф из-за недорастворения, связанный с потерей взаимодействия между растворителем и контактирующей поверхностью субъединиц комплекса. Баланс между энергией сольватации и энергией взаимодействия субъединиц между собой в газовой фазе определяет стабильность образованных комплексов.

В рассматриваемых комплексах вклад от полярного взаимодействия с растворителем оказался выше стабилизирующего вклада от электростатических взаимодействий молекул комплекса. Энергетически выгодное образование комплексов обеспечивалось за счет стабилизирующего вклада от неполярных взаимодействий.

**Таблица 1.** Вклад отдельных энергетических термов в полную свободную энергию образования комплексов

	чФНО/ФНОСД-ВОК	чФНО/ФНОСД-ВНО
$\Delta E_{\text{vdw}}$ (ккал/моль)	-115.8	-113.1
$\Delta E_{\text{el}}$ (ккал/моль)	-438.06	-662.26
$\Delta E_{\text{gas}}$ (ккал/моль)	-553.86	-775.36
$\Delta G_{\text{GB}}$ (ккал/моль)	563	780
$\Delta G_{\text{NP}}$ (ккал/моль)	-14.81	-18.45
$\Delta G_{\text{solv}}$ (ккал/моль)	548.19	761.55
$\Delta G_{\text{bind}}$ (ккал/моль)	-5.6	-13.81
$KD_{\text{exp}}$ (моль)	$2,48 \times 10^{-9}$	$4,10 \times 10^{-9}$

$\Delta E_{\text{vdw}}$  – Ван-Дер-Ваальсовое взаимодействие;  $\Delta E_{\text{el}}$  – электростатическое взаимодействие;  $\Delta E_{\text{gas}}$  – энергия взаимодействия в газовой фазе;  $\Delta G_{\text{GB}}$  – полярное взаимодействие с растворителем;  $\Delta G_{\text{NP}}$  – неполярное взаимодействие с растворителем,  $\Delta G_{\text{solv}}$  – свободная энергия сольватации;  $\Delta G_{\text{bind}}$  – суммарная свободная энергия взаимодействия;  $KD_{\text{exp}}$  – экспериментально измеренная константа образования комплексов.

Разница в энергии образования комплексов между ФНОСД-ВНО/чФНО и ФНОСД-ВОК/чФНО в основном определялась различным вкладом от электростатических взаимодействий белков между собой.

Как можно видеть из табл. 1, абсолютная свободная энергия неполярного взаимодействия с растворителем ( $\Delta G_{NP}$ ) выше для комплекса ФНОСД-ВНО/чФНО, что говорит о большей площади контакта между сильнее взаимодействующими белками.

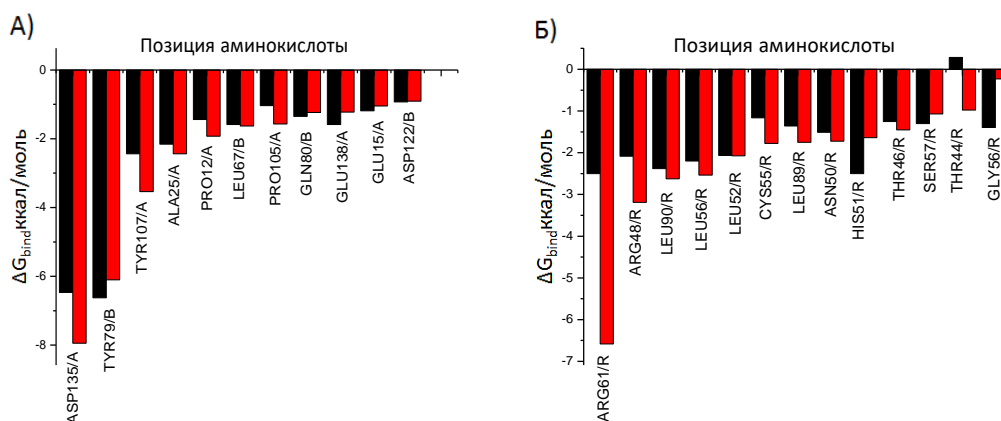
### SPR-анализ эффективности взаимодействия рекомбинантных белков ВНО-CrmB и ВОК-CrmB с чФНО

Продукцию рекомбинантных вирусных белков ВНО-CrmB и ВОК-CrmB в культуре клеток насекомых Sf-21 и их очистку производили как описано ранее (Гилева и др., 2005) [41].

Исследование аффинности взаимодействия рекомбинантных вирусных рецепторов ВНО-CrmB и ВОК-CrmB с соответствующими лигандами SPR-анализом показало, что  $KD_{exp}$  для вирусных рецепторов по отношению к ФНО различной видовой принадлежности отличаются. Так  $KD_{exp}$  для комплекса ВНО-CrmB/чФНО составляет  $2,48 \times 10^{-9}$ ;  $KD_{exp}$  для комплекса ВОК-CrmB/чФНО составляет  $4,10 \times 10^{-9}$ .

### Ключевые аминокислоты, участвующие в образовании комплексов

Нами было проведено разложение свободной энергии по аминокислотным остаткам с целью определения их вклада в энергию связывания комплексов. Результаты разложения энергии представлены на рис. 3, А и 3, Б, где показаны аминокислоты ФНО и ФНОСД, соответственно, вносящие наибольший положительный вклад в энергию взаимодействия ( $\Delta G < -2$  ккал/моль). Можно выделить до 12-ти аминокислотных остатков в ФНО человека и до 13 аминокислотных остатков в белках ФНОСД-ВНО и ФНОСД-ВОК, имеющих наибольший вклад в стабилизацию и дестабилизацию комплексов, образованных с участием этих белков.



**Рис. 3.** Вклад отдельных аминокислот в энергию образования комплексов ФНОСД-ВОК/чФНО, ФНОСД-ВНО/чФНО. **А:** Вклад аминокислот чФНО. **Б:** Вклад аминокислот ФНОСД-ВОК и ФНОСД-ВНО. Черные блоки соответствуют аминокислотам комплекса чФНО/ФНОСД-ВОК, красные блоки – чФНО/ФНОСД-ВНО. По оси абсцисс обозначены название и позиция аминокислоты, субъединица комплекса, в которую данная аминокислота входит.

Во всех исследуемых комплексах наибольший вклад в энергию образования комплекса вносит аспарагиновая кислота ASP135/A, которая образует солевой мостик с лизином ФНОСД LYS97. Аминокислота TYR79/B вносит значительный вклад за счет гидрофобного взаимодействия с ФНОСД, а также образования водородной связи с NH группой скелета аминокислоты SER47/R ФНОСД. Тирозин TYR107/A вносит вклад преимущественно за счет гидрофобных взаимодействий. Однако в случае ФНОСД-



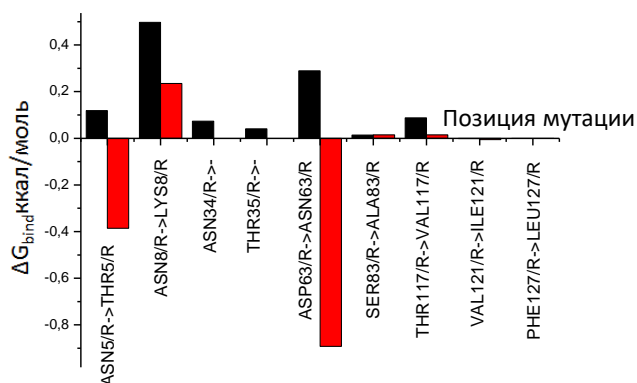
ВНО TYR107/A также участвует в образовании водородных связей с NH группой остова LYS97/R и NH группой радикала ASN61/R. NH группа остова ALA25/A образует водородную связь с кислородом остова цистеина CYS55/R.

Аминокислоты ФНО PRO12/A, LEU67/B, PRO105/A и аминокислоты ФНОСД LEU90/R, LEU56/R, LEU52/R, LEU89/R, LEU90/R, THR46/R, SER57/R вносят существенный вклад за счет вклада от гидрофобных взаимодействий. Глутаминовая кислота GLU15/A участвует в образовании солевого мостика с аминокислотой ARG61/R. ARG48/R вносит вклад за счет выигрыша в неполярной свободной энергии при образовании комплексов. Азот аминокислоты глицина GLY60/R (ФНОСД) образует водородную связь с кислородом остова аланина ALA137/A в случае чФНО. Аминокислоты ASN50/R и HIS51/R стабилизируют образование комплексов за счет водородных связей с остовом ФНО.

Следует отметить, что рассмотренные аминокислоты, имеющие наибольший вклад в энергию образования комплексов, являются консервативными в семействах белков ФНО и ФНО-связывающих белков, что дополнительно свидетельствует об их функциональной значимости.

### Влияние аминокислотных замен на стабильность комплексов

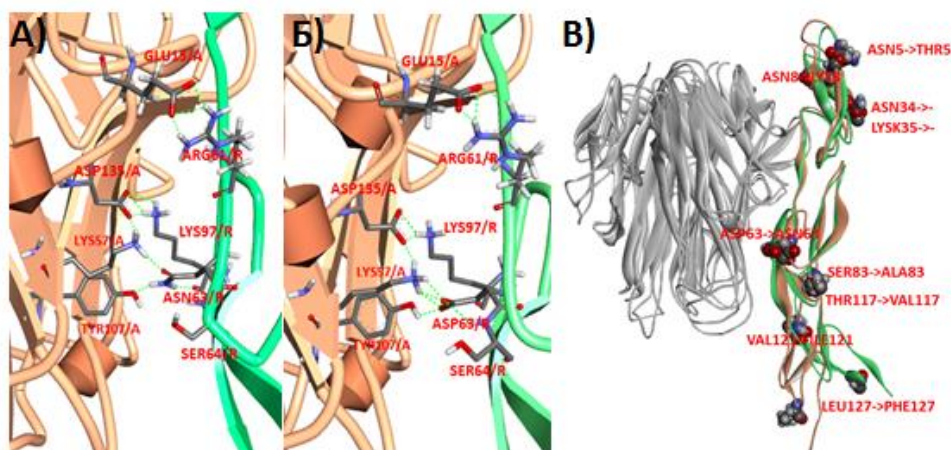
Аминокислотные замены и их вклад в энергию образования комплексов показаны на рис. 4. Как можно видеть, аминокислотные замены в последовательностях ФНОСД-ВОК и ФНОСД-ВНО не вносят большого вклада в энергию образования комплексов, однако они могут способствовать образованию подходящего окружения для эффективного взаимодействия «горячих аминокислот» между собой. В частности THR5/R→ASN5/R, ASN8/R→LYS8/R, ALA83/R→SER83/R не вносят непосредственного вклада в стабилизацию комплексов, т.к. они не находятся на участке, контактирующем с ФНО, так же, как и делеция аминокислот ASN34/R и THR35/R.



**Рис. 4.** Вклад аминокислот, отличающихся в последовательности ФНОСД-ВОК и ФНОСД-ВНО, в свободную энергию образования комплексов. Черные блоки соответствуют аминокислотам ФНОСБ-ВОК, красные блоки – ФНОСБ-ВНО. По оси абсцисс – название и позиция аминокислотной замены, субъединица комплекса, в которую входит аминокислотная замена.

На рис. 5,А представлено наложение усредненных структур ФНОСД-ВОК и ФНОСД-ВНО в ходе последних 4 нс молекулярной динамики исследуемых комплексов. Как можно видеть, структуры ФНОСД-ВОК и ФНОСД-ВНО имеют схожую конформацию в областях CRD1 и CRD2 доменов. Существенные отличия в конформациях ФНОСД-ВОК и ФНОСД-ВНО наблюдаются в области CRD3 домена белков. Аминокислотные замены в последовательности ФНОСД-ВОК приводят к большему взаимодействию CRD3 домена ФНОСД-ВНО с ФНО, что также приводит к большей площади взаимодействия между белками. Наиболее вероятно, что это связано

с образованием водородных связей азотной группы радикала ASN63/R с атомом кислорода остова ФНОСД LYS95/R и остатком TYR107/R, которые приводят к стабилизации взаимодействия ФНОСД-ВНО с ФНО (рис. 5,А,Б). Сближение участков белков ФНОСД-ВНО с ФНО приводит к более эффективному взаимодействию между полярными аминокислотами ARG61/R ФНОСД-ВНО и GLU15/A ФНО, что приводит к выигрышу  $>4$  ккал/моль в энергии образования комплексов (рис. 3,Б). Так же, аспарагиновая кислота ASP63/R в последовательности ФНОСД-ВОК может ослаблять образование солевых мостиков между аминокислотами ASP135/A с лизином LYS94/R, что видно по меньшему вкладу ASP135/A в свободную энергию образования комплексов в случае комплекса чФНО/ФНОСД-ВОК.



**Рис. 5.** Усредненные структуры комплексов чФНО/ФНОСД-ВОК и чФНО/ФНОСД-ВНО в ходе последних 4 нс молекулярной динамики. **А:** Интерфейс взаимодействия чФНО и ФНОСД-ВНО в окрестности аминокислоты ASN63 ФНОСД-ВОК. **Б:** Интерфейс взаимодействия чФНО и ФНОСД-ВОК в окрестности аминокислоты ASP63 ФНОСД-ВОК. **В:** Трёхмерное наложение структур комплексов чФНО/ФНОСД-ВОК и чФНО/ФНОСД-ВНО. Аминокислоты, отличающиеся в последовательностях ФНОСД-ВОК и ФНОСД-ВНО, показаны шариковой моделью. Аминокислоты, участвующие в связывании, отмечены спичечной моделью. Водородные связи показаны штрихованными линиями.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проведено моделирование молекулярной динамики моделей комплексов чФНО/ФНОСД-ВОК, чФНО/ФНОСД-ВНО. С использованием метода неявного представления воды ММ-GBSA было показано, что свободная энергия образования комплексов с чФНО, в которых участвует ФНОСД-ВНО, превосходит энергию комплексов, в которых участвует ФНОСД-ВОК.

С использованием метода поверхностного плазмонного резонанса были получены оценки эффективности взаимодействия рекомбинантных ФНОСД-ВНО и ФНОСД-ВОК с чФНО. Оказалось, что данные компьютерного предсказания хорошо согласуются с экспериментально полученными данными по аффинности взаимодействия изучаемых белковых комплексов.

Анализ вкладов в энергию взаимодействия, рассчитанную с помощью метода ММ-GBSA, показал, что полярные взаимодействия оказывают существенный вклад в специфичность взаимодействия ФНО с ортопоксвирусными ФНОСД. В комплексах с чФНО положительная абсолютная энергия образования комплексов определяется за счет неполярных взаимодействий.

Использование протокола разложения свободной энергии ММ-GBSA позволило выявить ключевые аминокислоты, участвующие в стабилизации анализируемых комплексов белков, а также объяснить наблюдаемую разницу в энергии образования этих комплексов. Было обнаружено, что аминокислоты ASP135, GLU138, TYR107,

TYR79, SER78 в последовательности ФНО человека, а также аминокислоты ARG61, ARG48 в последовательностях ФНОСД-ВОК и ФНОСД-ВНО, являются ключевыми в стабилизации всех рассматриваемых комплексов.

Анализ аминокислотных замен в последовательностях ФНО и ФНОСД, выполненный с использованием молекулярной динамики, позволил сделать вывод о том, что аминокислотная замена ASP63 на ASN63 приводит к более эффективному связыванию ФНОСД-ВНО с ФНО человека по сравнению с ФНОСД-ВОК.

Результатом данной работы стало более глубокое понимание молекулярных механизмов взаимодействия ФНО-связывающего белка вирусов натуральной оспы и оспы коров с ФНО. В дальнейшем мы планируем использовать выбранные подходы моделирования при экспериментальном исследовании аминокислотных замен, усиливающих или ослабляющих взаимодействия комплексов, с целью создания эффективных лекарственных препаратов на основе ортопоксвирусного ФНО-связывающего белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 12-04-00110а).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hsia E.C., Ruley K.M., Rahman M.U. Infliximab (Remicade®): from bench to clinical practice. A paradigm shift in rheumatology practice. *APLAR J. Rheumatol.* 2006. V. 9. P. 107–118.
2. Harriman G., Harper L.K., Schaible T.F. Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNFalpha treatment. *Ann. Rheum. Dis.* 1999. V. 58. № 1. P. 161–164.
3. Mohler K.M., Torrance D.S., Smith C.A., Goodwin R.G., Stremmer K.E., Fung V.P., Madani H., Widmer M.B. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J. Immunol.* 1993. V. 151. № 3. P. 1548–1561.
4. Weinblatt M.E., Keystone E.C., Furst D.E., Moreland L.W., Weisman M.H., Birbara C.A., Teoh L.A., Fischkoff S.A., Chartash E.K. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum.* 2003. V. 48. № 1. P. 35–45.
5. Gartlehner G., Hansen R.A., Jonas B.L., Thieda P., Lohr K.N. The comparative efficacy and safety of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis. *J. Rheumatol.* 2006. V. 33. № 12. P. 2398–2408.
6. Kirou K., Mavragani C.P. TNF antagonists in the management of early rheumatoid arthritis: An overview. *International Journal of Advances in Rheumatology.* 2006. V. 4. P. 49–56.
7. Gómez-Reino J.J., Carmona L., Angel Descalzo M., Biobadaser Group. Risk of tuberculosis in patients treated with tumor necrosis factor antagonists due to incomplete prevention of reactivation of latent infection. *Arthritis Rheum.* 2007. V. 57. № 5. P. 756–761.
8. Calabrese L.H., Zein N., Vassilopoulos D. Safety of antitumor necrosis factor (anti-TNF) therapy in patients with chronic viral infections: hepatitis C, hepatitis B, and HIV infection. *Ann. Rheum. Dis.* 2004. V. 63. № 2. P. 18–24.
9. Maini R.N., Taylor P.C. Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Med.* 2000. V. 51. P. 207–229.
10. Blinov V.M., Shchelkunov S.N., Sandakhchiev L.S. A possible molecular factor responsible for the generalization of smallpox infection. *Dokl. Akad. Nauk.* 1993. V. 328. № 1. P. 109–111.

11. Shchelkunov S.N., Blinov V.M., Sandakhchiev L.S. Genes of variola and vaccinia viruses necessary to overcome the host protective mechanisms. *FEBS Lett.* 1993. V. 319. № 1–2. P. 80–83.
12. Орловская И.А., Цырендоржиев Д.Д., Топоркова Л.Б., Курилин В.В., Лопатникова Ю.А., Вязовая Е.А., Гилева И.П., Щелкунов С.Н., Сенников С.В. Биологические эффекты рекомбинантного белка вируса натуральной оспы, связывающего фактор некроза опухолей. *Медицинская иммунология.* 2012. Т. 14. № 1–2. С. 33–42.
13. Massova I, Kollman P.A. Computational alanine scanning to probe protein–protein interactions: a novel approach to evaluate binding free energies. *J. Am. Chem. Soc.* 1999. V. 121. P. 8133–8143.
14. Zoete V., Michielin O. Comparison between computational alanine scanning and per-residue binding free energy decomposition for protein–protein association using MM-GBSA: application to the TCR-p-MHC complex. *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* 2007. V. 67. P. 1026–1047.
15. Zoete V., Meuwly M., Karplus M. Study of the insulin dimerization: binding free energy calculations and per-residue free energy decomposition. *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* 2005. V. 61. P. 79–93.
16. Gohlke H., Kiel C., Case D.A. Insights into protein–protein binding by binding free energy calculation and free energy decomposition for the Ras–Raf and Ras–RalGDS complexes. *J. Mol. Biol.* 2003. V. 330. P. 891–913.
17. Wang W., Kollman P.A. Free energy calculations on dimer stability of the HIV protease using molecular dynamics and a continuum solvent model. *J. Mol. Biol.* 2000. V. 303. P. 567–582.
18. Pintus S.S., Ivanisenko N.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Ramachandran S., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* 2013. V. 31. № 1. P. 78–89.
19. Gahoi Sh., Mandal R.Sh., Ivanisenko N., Shrivastava P., Jain S., Singh A.K., Raghunandan M.V., Kanchan S., Taneja B., Mandal Ch., Ivanisenko V.A., Kumar A., Kumar R. Open Source Drug Discovery Consortium, Srinivasan Ramachandran. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* 2013. V. 31. № 1. P. 30–43.
20. Chong L.T., Duan Y., Wang L., Massova I., Kollman P.A. Molecular dynamics and free-energy calculations applied to affinity maturation in antibody 48G7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999. V. 96. P. 14330–14335.
21. Tsui V., Case D.A. Theory and applications of the generalized born solvation model in macromolecular simulations. *Biopolymers.* 2000. V. 56. P. 275–291.
22. Onufriev A., Bashford D., Case D.A. Modification of the generalized Born model suitable for macromolecules. *J. Phys. Chem. B.* 2000. V. 104. P. 3712–3720.
23. Shchelkunov S.N., Uvarova E.A., Totmenin A.V., Safronov P.F., Sandakhchiev L.S. Species-specific differences in the organization of the complement-binding protein of orthopoxviruses. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2001. V. 379. P. 257–261.
24. Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Babkin I.V., Safronov P.F., Ryazankina O.I., Petrov N.A., Gutorov V.V., Uvarova E.A., Mikheev M.V., Sisler J.R., Esposito J.J., Jahrling P.B., Moss B., Sandakhchiev L.S. Human monkeypox and smallpox viruses: genomic comparison. *FEBS Lett.* 2001. V. 509. № 1. P. 66–70.
25. Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Safronov P.F., Gutorov V.V., Ryazankina O.I., Petrov N.A., Babkin I.V., Uvarova E.A., Mikheev M.V., Sisler J.R., Esposito J.J., Jahrling P.B., Moss B., Sandakhchiev L.S. Multiple genetic differences between the monkeypox and variola viruses. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2002. V. 384. P. 143–147.
26. Gileva I.P., Nepomnyashchikh T.S., Antonets D.V., Lebedev L.R., Kochneva G.V., Grazhdantseva A.V., Shchelkunov S.N. Properties of the recombinant TNF-binding proteins from variola, monkeypox, and cowpox viruses are different. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1764. № 11. P. 1710–1718.

27. Alejo A., Ruiz-Argüello M.B., Ho Y., Smith V.P., Saraiva M., Alcami A. A chemokine-binding domain in the tumor necrosis factor receptor from variola (smallpox) virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 15. P. 5995–6000.
28. Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M., PROCHECK – a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Cryst.* 1993. V. 26. P. 283–291.
29. Laskowski R.A., Rullmann J.A., MacArthur M.W., Kaptein R., Thornton J.M. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol NMR*. 1996. V. 8. P. 477–486.
30. Duan Y., Wu C., Chowdhury S., Lee M.C., Xiong G., Zhang W., Yang R., Cieplak P., Luo R., Lee T., Caldwell J., Wang J., Kollman P. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.* 2003. V. 24. P. 1999–2012.
31. Case D.A., Darden T.A., Cheatham III T.E., Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Walker R.C., Zhang W., Merz K.M., Roberts S., Hayik S., Roitberg A., Seabra G., Swails J., Götz A.W., Kolossvy I., Wong K.F., Paesani F., Vanicek J., Wolf R.M., Liu J., Wu X., Brozell S.R., Steinbrecher T., Gohlke H., Cai Q., Ye X., Wang J., Hsieh M.-J., Cui G., Roe D.R., Mathews D.H., Seetin M.G., Salomon-Ferrer R., Sagui C., Babin V., Luchko T., Gusarov S., Kovalenko A., Kollman P.A. *AMBER 12*. San Francisco: University of California, 2012.
32. Darden T., York D., Pedersen L. Particle mesh Ewald: an N log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 1993. V. 98. P. 10089–10092.
33. Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T., Lee H., Pedersen L. A smooth particle mesh ewald potential. *J. Chem. Phys.* 1995. V. 103. P. 8577–8592.
34. Coleman T.G., Mesick H.C., Darby R.L. *Ann. Biomed. Eng.* 1977. V. 5. P. 322.
35. Hou T., Wang J., Li Y., Wang W. Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Inf. Model.* 2011. V. 51. P. 69–82.
36. Miller B.R., Dwight McGee T., Swails J.M., Homeyer N., Gohlke H., Roitberg A.E. MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* 2012. V. 8. № 9. P. 3314–3321.
37. Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 2006. V. 22. P. 195–201.
38. Kiefer F., Arnold K., Künzli M., Bordoli L., Schwede T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research*. 2009. V. 37. P. D387–D392.
39. Peitsch M.C. Protein modeling by E-mail Bio/Technology. *Nature Biotechnology*. 1995. V. 13. P. 658–660.
40. Nepomniashchikh T.S., Antonets D.V., Lebedev L.R., Gileva I.P., Shchelkunov S.N. Modeling spatial structures of variola and cowpox virus TNF-binding CrmB proteins bound to murine or human TNF. *Mol. Biol. (Mosk.)*. 2010. V. 44. № 6. P. 1054–1063.
41. Gileva I.P., Riazankin I.A., Nepomniashchikh T.S., Totmenin A.V., Maksutov Z.A., Lebedev L.R., Afinogenova G.N., Pustoshiliva N.M., Shchelkunov S.N. Expression of genes for orthopoxviral TNF-binding proteins and study resulted recombinant proteins. *Mol. Biol. (Mosk.)*. 2005. V. 39. № 2. P. 245–254

Материал поступил в редакцию 23.07.2013, опубликован 06.09.2013.