



Рис. 2 – Спектры флуоресценции ThT в инсулине при температуре 37 °C

Молекулярный механизм, лежащий в основе формирования амилоидов, до сих пор не выяснен. Связано это с тем, что большое количество факторов может повлиять на конформационный переход белка из нативного состояния в патологическое, с образованием агрегатов. К таким факторам относят протеолитическое расщепление белка, мутации, взаимодействия с лигандами, высокая концентрация белка и другие. Образование амилоидов многими белками, регулируемость этого процесса, широкое распространение в природе подчеркивает биологическую необходимость этих формирований. Исследования в этой области могут быть существенны для формирования представлений об механизме образования амилоидных фибрилл, а также для усовершенствования инсулиновой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Довидченко, Н. В. Механизмы образования амилоидных фибрилл / Н.В. Довидченко, Е.И. Леонова, О.В. Галзитская // Успехи биологической химии. 2014;54:203–230.
2. Сурин А. К. Определение амилоидогенных участков, входящих в остов фибрилл инсулина / А.К. Сурин, С.Ю. Гришин, О.В. Галзитская // Биохимия. 2019;84:129–137.
3. Сулацкая А. И. Исследование кинетики образования амилоидных фибрилл на основе инсулина / А.И. Сулацкая, Е.А. Волова, Я.Ю. Комиссарчик // Цитология. 2013;55:809–813.

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЛИГАНДОВ БЕЛКА S1 SARS-COV-2 MODELING OF POTENTIAL PROTEIN S1 SARS-COV-2 LIGANDS

С. Д. Бруякин^{1,2}, Д. А. Макаревич¹
S. Bruyakin^{1,2}, D. Makarevich¹

¹ГНУ «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»,
Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
Минск Республика Беларусь²
bruyakin.sergey@gmail.com

¹Institute of bioorganic chemistry NAN Belarus, Minsk, Republic of Belarus¹

²Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

S1 домен S белка SARS-CoV-2 (далее S1 белок) – вероятно является основным фактором патогенеза при COVID-19. По нашему мнению, элиминация или снижение концентрации этого белка будет уменьшать воспалительный процесс и, соответственно, повреждение органов и тканей активированной иммунной системой. Проведение анализа комплексов Ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2) и S1 белка (ACE2-S1), позволит определить олигопептиды, которые являются лигандами для связывания S1 белка, своевременное удаление которого из крови пациентов с коронавирусной инфекцией (COVID-19) позволит предотвратить развитие тяжелых мультиорганных осложнений. Кроме того, иммобилизованный олигопептид, связывающий S1 белок, будет способен удалять из организма вирусные частицы, находящиеся во внеклеточном пространстве [1].

The S1 protein of SARS-CoV-2 (hereinafter referred to as the S1 protein) is probably the main factor in the pathogenesis of COVID-19. In our opinion, the elimination or decrease in the concentration of this protein will reduce the inflammatory process and, accordingly, damage to organs and tissues by the activated immune system. An analysis of the complexes of the Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and the S1 protein (ACE2-S1) will determine the oligopeptides that are ligands for binding the S1 protein, the timely removal of which from the blood of patients with COVID-19 will prevent the development of severe multi-organ complications. Besides, the immobilized oligopeptide that binds the S1 protein will be able to remove from the body viral particles located in the extracellular space [1].

Ключевые слова: S1 белок, SARS-CoV-2, COVID-19, ангиотензинпревращающий фермент 2, молекулярный докинг, компьютерное моделирование.

Keywords: S1 protein, SARS-CoV-2, COVID-19, angiotensin converting enzyme 2, molecular docking, computer modeling.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-2-27-30>

В начале декабря 2019 г. первые случаи пневмонии неизвестного происхождения были выявлены в городе Ухань, провинция Хубэй, Китай. Высокопроизводительное секвенирование выявило новый бета-коронавирус, который в настоящее время называется новым коронавирусом 2019 г.

Гипервоспаление при COVID-19 может вызывать цитопению, коагулопатию, повреждение тканей, дисфункцию печени и активацию макрофагов, а также имеет признаки реактивного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза. Сверхпродукция воспалительных цитокинов может вызвать дисфункцию органов и, в конечном итоге, смерть.

Эти симптомы и связанные с ними лабораторные показатели сильно напоминают синдром токсического шока, усиление цитотоксического адаптивного иммунного ответа, при связывании патогенных суперантигенов с молекулами МНСII и рецепторами Т-клеток (TCR). Белок «шип» SARS-CoV-2 (далее S белок), играет ключевую роль в распознавании рецепторов и слияния с мембраной клетки. Согласно некоторым данным S белок содержит аминокислотный мотив с высоким сродством к TCR (тесно взаимодействует с комплементарными областями переменных доменов α - и β -цепей). Связывающий эпитоп S1 белка содержит последовательность аминокислот, уникальную для SARS-CoV-2, которая очень похожа по структуре на бактериальные суперантигены. Эти данные предполагают, что S белок может действовать как суперантиген, стимулируя развитие цитокинового шторма у пациентов с COVID-19, также эти сведения имеют важное значение для разработки терапевтических подходов лечения COVID-19 [2].

Помимо местного повреждения, цитокиновый шторм также может оказывать системное действие на организм. Повышенный уровень цитокинов, таких как TNF- α , может вызвать септический шок и полиорганную недостаточность. Это может привести к повреждению миокарда и недостаточности кровообращения, наблюдаемым у некоторых пациентов. У пожилых людей (старше 60 лет) и людей с сопутствующими заболеваниями чаще развивается дисфункциональный иммунный ответ, который провоцирует патологические реакции. Точные причины этого неясны, хотя одной из причин может быть старение микроокружения легких, вызывающее измененное созревание дендритных клеток и их миграцию в лимфоидные органы, и тем самым нарушение активации Т-клеток. Напротив, у детей, как правило, не развивается тяжелое заболевание, несмотря на то что они могут иметь высокие титры вируса. Во всех возрастных группах младше 18 лет более 50% детей имели легкие симптомы или не имели симптомов, при этом менее чем у 6% детей развивались тяжелые симптомы. Таким образом полная картина критических иммунных факторов хозяина, которые лежат в основе развития более серьезных воспалительных реакций у некоторых пациентов, остается плохо определенной.

Научная гипотеза: S1 белок – основной фактор патогенеза при COVID-19. Элиминация или снижение концентрации этого белка будет уменьшать воспалительный процесс и, соответственно, повреждение органов и тканей активированной иммунной системой. Проведение анализа комплекса ACE2-S1 позволит определить олигопептиды, которые являются лигандами для связывания S1 белка, своевременное удаление которого из крови пациентов с COVID-19, позволит предотвратить развитие тяжелых мультиорганных осложнений течения данного заболевания.

В составе комплексного лечения COVID-19 используется гемосорбционная терапия, которая позволяет удалять из циркуляторного русла излишки провоспалительных цитокинов тем самым нормализуя биохимические показатели и редуцируя гипервоспаление.

Гемосорбция – это экстракорпоральный метод, принцип метода заключается в прохождении крови через картридж, где растворенные вещества селективно связываются с материалом сорбента.

Экстракорпоральное очищение крови было предложено как дополнение к комплексному лечению пневмонии вызванной SARS-CoV-2. Принцип лечения заключается в удалении провоспалительных цитокинов. Одним из одобренных методов очистки крови является использование CytoSorb (CytoSorbents Corp., Monmouth Junction, Нью-Джерси, США), нового устройства, в котором используются микрогранулы биосовместимого пористого полимерного адсорбента для удаления медиаторов воспаления. Несколько ретроспективных

исследований подтвердили, что гемосорбция может эффективно снижать уровни воспалительных факторов и значительно уменьшать смертность у пациентов с тяжелым септическим шоком [3].

Согласно результатам исследований университета медицинских наук Боболь, Иран гемосорбционная терапия способствует не только снижению концентрации цитокинов в плазме крови, но и улучшению оксигенации крови.

В исследовании приняли участие пять мужчин и пять женщин, средний возраст которых составил $57,30 \pm 18,07$ года; у шести из них наблюдалось улучшение после вмешательства. Все участники прошли три сеанса гемоперфузии с применением смолы с использованием непрерывной заместительной почечной терапии с режимом непрерывной венозно-венозной гемофильтрации. Насыщение кислородом периферических капилляров (SpO₂) изменялось после каждого сеанса. Среднее значение SpO₂ перед тремя сеансами гемоперфузии составляло $89,60 \pm 3,94\%$, а после них увеличилось до $92,13 \pm 3,28\%$ ($p < 0,001$). Уровень IL-6 в сыворотке снизился с $139,70 \pm 105,62$ до $72,06 \pm 65,87$ пг / мл ($p = 0,073$); а с-реактивный белок уменьшился с $136,25 \pm 84,39$ до $78,25 \pm 38,67$ мг/л ($P = 0,016$) [4].

Для анализа центра связывания ACE2-S1 использовали web сервис Protein Interactions Calculator (PIC) результаты представлены в таблицах 1–3, по нашему мнению, для моделирования олигопептидных лигандов наиболее привлекательными являются взаимодействия с длиной связи до 3 Å.

Таблица 1 – Водородные взаимодействия в центре связывания ACE2-S1

ACE2				S1 белок		
Позиция	Аминокислота	Атом	Длина связи, Å	Позиция	Аминокислота	Атом
502	GLY	N	2,78	353	LYS	O
30	ASP	OD2	2.90	417	LYS	NZ
42	GLN	NE2	3.24	446	GLY	O
38	ASP	OD2	2.70	449	TYR	OH
38	ASP	OD1	3.18	449	TYR	OH
42	GLN	NE2	2.79	449	TYR	OH
24	GLN	OE1	2.69	487	ASN	ND2
83	TYR	OH	2.79	487	ASN	OD1
31	LYS	NZ	2.93	493	GLN	NE2
34	HIS	O	3.35	493	GLN	NE2
35	GLU	N	3.47	493	GLN	NE2
35	GLU	OE2	3.50	493	GLN	NE2
35	GLU	OE1	3.13	493	GLN	NE2
353	LYS	NZ	3.08	496	GLY	O
42	GLN	OE1	3.38	498	GLN	NE2
42	GLN	NE2	2.93	498	GLN	NE2
41	TYR	OH	2.71	500	THR	OG1
355	ASP	OD2	3.34	500	THR	O
41	TYR	OH	3.43	501	ASN	OD1
37	GLU	OE2	3.46	505	TYR	OH

Всего обнаружено 20 водородных взаимодействий (таб. 1) длина связи варьировалась в пределах 2,69–3,7 Å.

Таблица 2 – Гидрофобные взаимодействия в центре связывания ACE2-S1 в пределах 5 Å

ACE2		S1 белок	
Позиция	Аминокислота	Позиция	Аминокислота
28	PHE	489	TYR
79	LEU	486	PHE
82	MET	486	PHE
83	TYR	486	PHE

При анализе центра связывания установлено 4 гидрофобных взаимодействия (таб. 2), длина связи в пределах 5 Å. Примечательно что во всех четырех случаях фигурирует аминокислота фенилаланин.

Таблица 3 – Ионные взаимодействия в центре связывания ACE2-S1 в пределах 6 Å

ACE2		S1 белок	
Позиция	Аминокислота	Позиция	Аминокислота
30	ASP	417	LYS
31	LYS	484	GLU
37	GLU	403	ARG

Определено 3 ионных взаимодействия (таб. 3), длина связи в пределах 6 Å. Также было найдено 1 ароматическое взаимодействие между 83 TYR S1 белка и 486 PHE ACE2 длина связи составила 5.15 Å и одно ароматическое взаимодействие между 82 MET и 486 PHE длина связи составила 4.28 Å.

На основе полученных данных в программе UCSF Chimera 1.15rc были сконструированы олигопептиды, а также выполнена оптимизация геометрии и минимизация энергии моделей пептидов и S1 белка методом AMBER. Молекулярный докинг проводили в UCSF Chimera 1.15rc с использованием расширения AutoDock Vina 1.1.2. В результате было получено 10 возможных вариантов связывания для каждого олигопептида, а также в программе рассчитаны значения RMSD l.b и RMSD u.b. для каждой позиции. Изначально для докинга использовалась модель S1 белка, полученная в результате обработки комплекса ACE2-S1 (PDB: 6M0J версия 2.5) эта модель имела сравнительно низкое расширение (2,45 Å) и некоторые проблемы с минимизацией энергии [5]. Поэтому для стандартизации докинга был использован S1 белок, вырезанный из комплекса ламового антитела и S1 белка (PDB: 6ZBP версия 1.0) разрешение полученной модели составило 1.85 Å. В таблице 4 представлены средние показатели связывания S1 белка и олигопептидных лигандов.

Таблица 4 – ΔG связывания олигопептидов с S1 белком

Олигопептиды	ΔG, -kcal / mol	ΔRMSD l.b.	ΔRMSD u.b.
GLN-ALA-LYS-THR-PHE	-5,84	5,45	8,1
PHE-LEU-ASP-LYS	-5,61	6,77	8,72
ASP-LYS-PHE-ASN-HIS	-6,1	9,09	11,62
ASP-LYS-PHE-ASN-HIS-GLU	-5,43	11,22	15,3
GLU-ALA-GLU-ASP	-5,37	7,75	9,92
ASP-LEU-PHE-TYR	-6,37	6,386	9,81
PHE-TYR-GLN	-6,49	13,62	16,32
LEU-ALA-GLN-MET-TYR	-5,91	7,28	10,61
LYS-GLY-ASP	-5,22	7,78	9,76
GLN-LYS-ASP-TYR	-5,95	3	6,52
GLN-ALA-LYS-THR-LEU-ASP-LYS	-4,59	8,47	12,59
GLN-ASP-ASP-TYR-GLN	-6,22	8,59	11,6

По нашему мнению, наиболее перспективными олигопептидами для проведения анализа in vitro являются модели с ΔG связывания менее -6 -kcal/mol.

ЛИТЕРАТУРА

1. Scaglione V, Soriano ER. Are Superantigens the Cause of Cytokine Storm and Viral Sepsis in Severe COVID-19? Observations and Hypothesis / Scaglione V, Soriano ER // Scandinavian Journal of Immunology. 2020.
2. Superantigenic character of an insert unique to SARS-CoV-2 spike supported by skewed TCR repertoire in patients with hyperinflammation / Cheng MH [et al.] // Proceedings of the National Academy of Science U.S.A. 2020;117:41:25254–25262.
3. Rescue of Cytokine Storm Due to HLH by Hemoadsorption in a CTLA4-Deficient Patient / Greil C [et al.] // Journal Of Clinical Immunology. 2017;37:3:273–276.
4. Effectiveness of extracorporeal blood purification (hemoadsorption) in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) / Asgharpour M [et al.] // BMC Nephrology. 2020;21:356:1–10.
5. Actual Environmental Problems: Proceedings of the X International Scientific Conference of young scientists, graduates, master and PhD students, 2020 November 21–22, Minsk, Republic of Belarus / ISEI BSU; Maskevitch SA, Lemiasheuski VO (ed.). – Minsk, 2020. – P. 67.