

Компьютерные модели пространственной структуры мутантных белков оболочки вируса гепатита С, влияющих на формирование вирусных частиц

О. В. Орлова¹, В. А. Орлов², С. Н. Кочетков¹, С. Н. Белжеларская¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

² ФКП «Научно-испытательный центр ракетно-космической промышленности», Пересвет, Россия

С использованием результатов предыдущих экспериментов по исследованию N-гликанов гликопротеина E1 вируса гепатита С в процессе сборки структурных белков вируса в модельной системе — клетках насекомых Sf9 с участием бакуловирусной системы экспрессии, в данной работе представлено моделирование структуры молекулы белка E1 с разным количеством и расположением гликанов. Компьютерные модели пространственной структуры мутантных белков

E1 построены с использованием метода молекулярной динамики и вычислительных мощностей компьютера. Результаты показывают, что N-связанные гликаны оказывают непосредственное влияние на сворачивание белков E1, демонстрируя значительные различия в конфигурациях форм таких молекул.

Ключевые слова: компьютерное моделирование, вирус гепатита С, гликопротеин E1, вирусные частицы.

Computer Models of Spatial Pattern of Mutant HCV Envelope Proteins Involving in Viral Particles Formation

O.V. Orlova¹, V.A. Orlov², S.N. Kochetkov¹, S.N. Beljelarskaya¹

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Research Trial Center of Rocket and Space Industry, Peresvet, Russia

Using the results from the previous experiments on N-glycans of *hepatitis C virus* (HCV) glycoprotein E1 in the process of structure viral proteins assembling in the model system (insect cells Sf9 and baculovirus expression system), simulation of protein E1 structure with different number and positions of glycans is presented in this paper. Computer simulation of spatial pattern of

mutant E1 proteins was performed using the method of molecular dynamics and computer processing power. Results of this study demonstrate that N-linked glycans have a direct effect on protein E1 folding and significantly differ in molecule configuration pattern.

Key words: computer simulation, hepatitis C virus, glycoprotein E1, viral particles.

Контактный адрес:

Светлана Николаевна Белжеларская

Эл. почта: belj@eimb.ru

Введение

Детальное строение вирусной частицы *вируса гепатита С* (ВГС) и способ ее формирования остаются малоизученными. В формировании инфекционных частиц ВГС участвуют гликопротеины оболочки вируса E1 и E2, причем предполагается, что свойства вириона зависят от гликозилирования последних в зараженной клетке, их взаимодействия и характера укладки [1–3]. Связанные с белками оболочки N-гликаны могут непосредственно воздействовать на сворачивание белков, образование функционального гликопротеинового комплекса, связывание вируса с клеткой и на другие процессы жизненного цикла ВГС [4–6]. Важную роль в фолдинге гликопротеинов играют лектиноподобные шапероны *эндоплазматического ретикулума* (ЭР) клетки, с которыми гликопротеин специфически взаимодействует, входя в кальнексин-кальретикулиновый цикл [7]. Следует отметить, что до сих пор окончательно неизвестно, какие именно сайты гликозилирования белков E1 и E2 ВГС существенны для их правильного функционирования и все ли потенциальные сайты «работают» *in vivo*. После гликозилирования гликопротеины E1 и E2 ВГС могут либо димеризоваться с образованием функциональных нековалентных комплексов, либо образовывать дисульфидные мостики и формировать агрегаты, содержащие неправильно свернутые нефункциональные белки [2, 3, 7]. Образование функциональных комплексов обеспечивает связывание вируса с рецепторами клетки и проникновение вирусной частицы в клетку, влияет на формирование его антигенного состава и, возможно, играет определенную роль в патогенезе. Формирование агрегатов, содержащих неправильно свернутые белки, может приводить к образованию дефектных вирусных частиц, которые могут подавлять способность вируса связываться с клеткой и нарушать выход вируса из последней [4, 5].

Моделировать процесс сворачивания молекулы белка и оценивать роль сайтов гликозилирования в этом процессе можно с помощью экспериментов *in silico*, с использованием вычислительных мощностей компьютеров и методов *молекулярной динамики* (МД) [8–17].

Задача данной работы состояла в построении модели пространственной структуры молекул белка E1, содержащей и не содержащей N-гликаны, оценке влияния последних на сворачивание белка и сравнении полученных данных с результатами, полученными нами ранее в эксперименте [1]. Для серьезных вычислений при построении модели пространственной структуры молекул белка необ-

ходимы соответствующие ресурсы. На сегодняшний день интересны выводы, полученные в результате расчетов при использовании компьютерных 3-D моделей трехмерных структур белков E1 в программе HyperChem [18], и их соответствие результатам наших биологических экспериментов.

Материал и методы

В настоящей работе исследовались мутантные формы гликопротеина E1 ВГС, генотип 1b, штамм 274933RU (AFI76573) [19] с поврежденными сайтами гликозилирования. При молекулярном моделировании влияния гликанов на их трехмерную структуру использовали компьютерные расчеты для различных фрагментов молекулы белка в вакууме и в водном окружении с применением методов молекулярной механики (оптимизации энергии) и молекулярной или ланжевеновой динамики. Расчеты проводили в программе вычислительной химии HyperChem v.6.01 (Hypercube, Inc), содержащей базы данных для ввода *аминокислот* (ак), с использованием компьютера АМД 1800МГц.

Для оценки формы молекулы E1 и влияния на нее N-гликанов и воды использовали 10 вариантов мутантного белка E1 ВГС (рис. 1) с делетированной C-концевой последовательностью. Тестовые расчеты проводили на фрагментах молекулы E1 разной длины и экстраполировали на всю молекулу E1. Использовали пять фрагментов молекулы белка различной длины: *short* молекула (19 аминокислот) – 268 атомов; *normal* молекула (38 аминокислот) – 538 атомов; *long* молекула (76 аминокислот) – 1098 атомов; *longlong* молекула (133 аминокислоты) – 1952 атома; *total* молекула (вся молекула E1, лишенная гликанов, 250 аминокислот) – 3739 атомов.

Расчет формы белка проводили следующим образом: набирали последовательность аминокислотных остатков из базы данных программы HyperChem с углами между отдельными атомами внутри каждого остатка аминокислоты в молекуле белка E1 разной длины. Затем задавали углы между атомами аминокислотных остатков, в результате получали предварительную трехмерную структуру молекулы белка E1. Далее проводили процедуру минимизации энергии молекулы. Для оптимизации геометрии структуры белка E1 подбирали положение всех атомов аминокислотных остатков таким образом, чтобы минимизировать энергию во время определения энергии всей молекулы. Вычисляли свободную энергию, дипольный момент и геометрические размеры каждой структуры, которые свидетельствовали о том, насколько свернута исследуемая молекула. Далее запускали

расчет молекулярной или ланжевенновской динамики, а затем геометрическую оптимизацию и процесс повторяли, минимизируя энергию молекулы до достижения оптимальной геометрии, в результате чего свернутая молекула приобретала определенную конформацию.

Результаты исследования и обсуждение

В нашей предыдущей работе [1] мы исследовали влияние удаления N-гликанов в определенных позициях белка E1 ВГС на его фолдинг, а также на сборку комплекса E1E2, представляющего собой функциональную субъединицу вирионной оболочки зрелой вирусной частицы. Это влияние анализировали с помощью сайт-направленного мутагенеза E1 в модельной системе — клетках насекомых Sf9, с участием бакуловирусной системы экспрессии. Полученные генетические конструкции кодировали десять вариантов белка E1 ВГС с мутациями в шести сайтах гликозилирования. На рис. 1а, 1б и 1в представлены структура исходного варианта белка E1 ВГС дикого типа с 218 аминокислотами, сайты N-гликозилирования в E1 ВГС и схематическое изображение мутантных вариантов гликопротеина E1 с нарушенными сайтами гликозилирования.

Результаты работы свидетельствовали, что белок E1 ВГС с разным количеством и расположением присоединенных гликанов ведет себя по-разному. В частности, было показано, что отсутствие углеводных цепей в сайтах гликозилирования N1 (196 ак) и N5 (305 ак) белка E1 приводит к неправильному сворачиванию последнего и, как следствие, к образованию нефункционального гетеродимера E1E2 в клетках Sf9.

Одним из возможных способов подтверждения результатов, полученных в биохимическом эксперименте, является математическое моделирование пространственной структуры белка E1, содержащего гликаны в указанных выше позициях. С этой целью в настоящей работе с использованием метода молекулярной динамики был проведен расчет оптимальной геометрии молекул белка E1 и построены компьютерные модели пространственной структуры мутантных белков E1.

Для подбора критериев, необходимых для полного расчета оптимальной геометрии молекул белка E1, как дикого, так и мутантного типа, проводили тестовый расчет фрагмента белка E1 в 38 ак (538 атомов), лишённого всех гликанов. Расчет показал, что при одном и том же времени счета с ланжевенновской и молекулярной динамикой полная энергия и геометрическая характеристика одновременно выходят на значение, характери-

зующее оптимальную конфигурацию фрагмента молекулы белка E1 (графики не представлены). Определение влияния времени расчета ланжевенновской динамики на геометрию молекулы указывало на то, что шаг по времени не влияет на скорость сходимости и, очевидно, на конечную геометрию молекулы. На достижение оптимальной геометрии молекулы влияет суммарное время ланжевенновской динамики. Наиболее информативным критерием достижения оптимальной геометрии молекулы белка является выход на плато энергии молекулы. Для поиска зависимости времени счета ланжевенновской динамики от числа атомов в молекуле, необходимого для выхода на плато минимальной энергии, проводили тестовый расчет пяти фрагментов белка E1 различной длины: 19 ак (268 атомов), 38 ак (538 атомов), 76 ак (1098 атомов), 133 ак (1952 атома) и 250 ак (3739 атомов). Определяли полную энергию и геометрическую характеристику в каждом из пяти случаев. Для всех пяти молекул E1 время выхода на плато составляло примерно 75, 150, 300, 500 и 1200 пикосекунд. С использованием полученных данных определили время, необходимое для полного расчета оптимальной геометрии молекул белка E1 на используемом компьютере. Зависимость процессорного времени компьютера от числа атомов в молекуле белка E1, необходимого для полного расчета оптимальной геометрии молекулы, представлена на рис. 2.

Интересно, что экстраполяция степени зависимости для трехмерной структуры белков на графике демонстрирует показатель степени, равной 2,7853, близкий к трем. Примерно такая же зависимость представлена в работе [9].

Программа HyperChem предусматривает возможность определения формы молекулы белка в водном окружении. Нами рассмотрено поведение в воде двух фрагментов молекулы E1: 19 ак (268 атомов) и 38 ак (538 атомов). Молекулы белка «сольватировали погружением» в кубическую ячейку воды. Оптимизацию геометрии исследовали в условиях Periodic box. Кривая сворачивания фрагмента молекулы E1 (538 атомов) в вакууме выходит на плато на 150-й пикосек., в то же время на плато выходит кривая разворачивания молекулы в воде. Значение энергии на кривой разворачивания молекулы в воде соответствует значению энергии на кривой сворачивания молекулы в вакууме и составляет 75 пикосек. Примерно такое же поведение и такое же соотношение энергий (70%) наблюдается и для более короткого фрагмента E1 19 ак (268 атомов).

Расчеты, полученные в HyperChem, соответствуют подобным расчетам оптимальной геоме-

трии молекулы в разработанной Firefly Project Team [10].

Таким образом, была исследована форма молекул 10 вариантов белка E1 ВГС с мутациями (см. рис. 1, *в*), с различным количеством и расположением гликанов. Рассчитанные формы 10

вариантов структурного белка E1 ВГС с мутациями представлены на рис. 3.

Масштаб каждого варианта белка подгоняли так, чтобы размер всех атомов углерода, азота, кислорода или серы были одинаковы для всех десяти вариантов. Водород не показан, чтобы не перегружать рисунок.

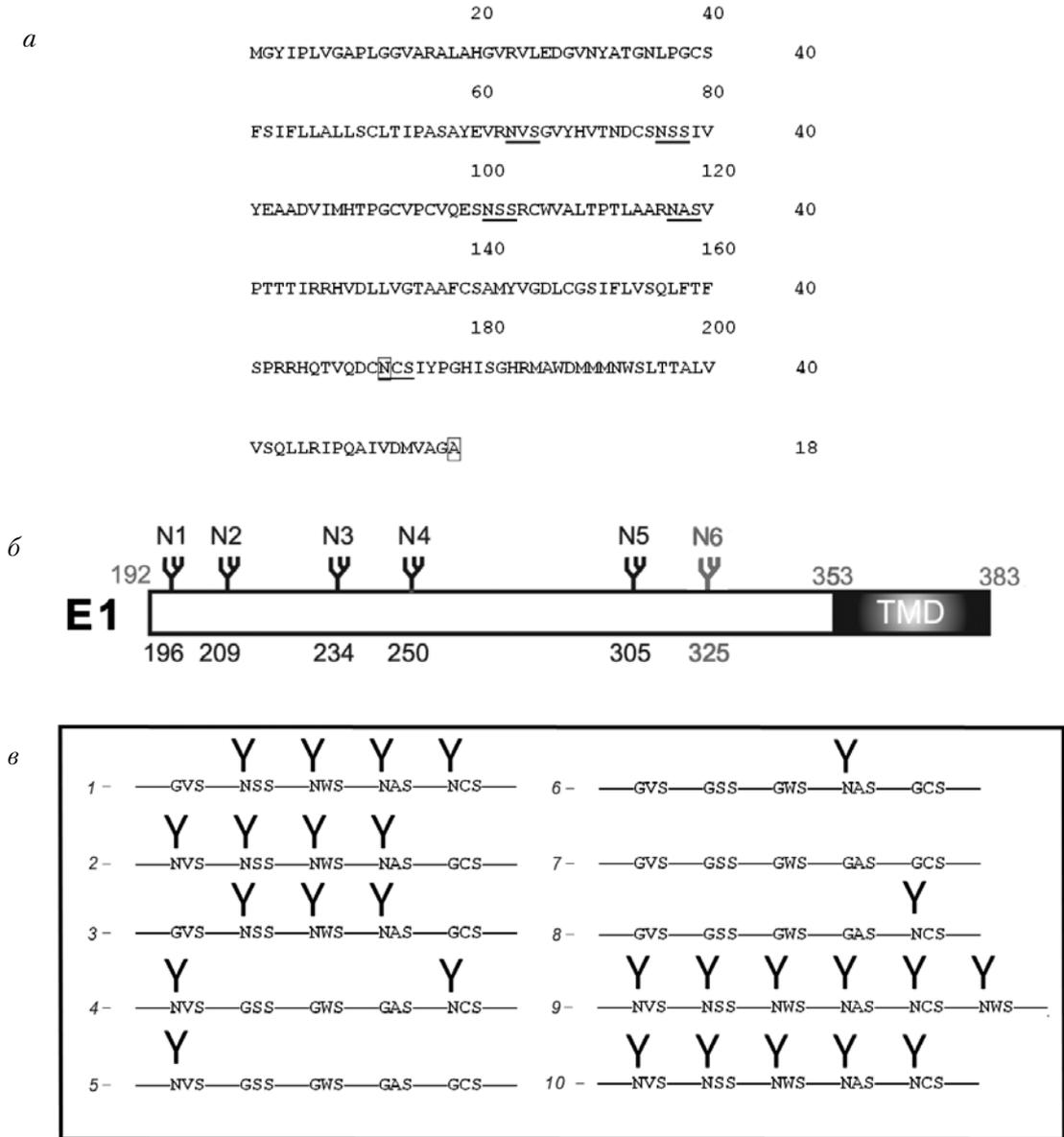


Рис. 1. Моделирование структуры молекулы белка E1 с разным количеством и расположением гликанов.

а – структура исходного варианта белка E1 ВГС дикого типа с 218 ак. Сайты присоединения гликанов подчеркнуты: [A] – первый выступающий из мембраны аминокислотный остаток, [N] – аспарагин, ближайший к мембране, к которому присоединен гликан.

б – сайты N-гликозилирования в E1 ВГС и его мутантных вариантах; схема расположения сайтов гликозилирования N1–N5 и дополнительного сайта N6 в полипептидной цепи E1 ВГС.

в – схематическое изображение мутантных вариантов гликопротеина E1 с модифицированными (нарушенными) сайтами гликозилирования:

1 – N1; 2 – N5; 3 – N1 и N5; 4 – N2, N3 и N4; 5 – N2, N3, N4 и N5; 6 – N1, N2, N3 и N5; 7 – N1– N5; 8 – N1, N2, N3 и N4; 9 – с введенным дополнительно сайтом гликозилирования N6; 10 – исходный вариант E1 дикого типа. Сайты гликозилирования отмечены знаком «Y».

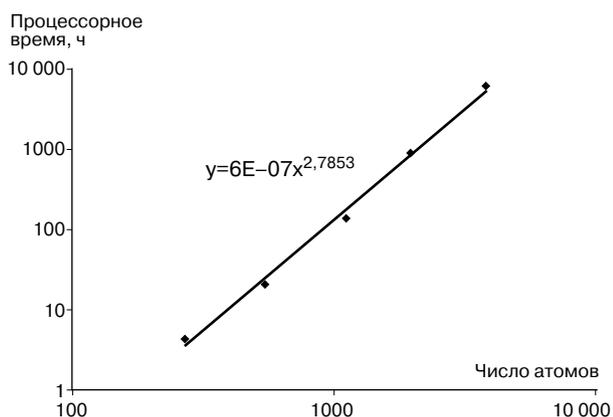


Рис. 2. Зависимость процессорного времени компьютера от числа атомов в молекуле E1, необходимого для полного расчета оптимальной геометрии молекулы.

Как видно, эти формы различаются между собой и отличаются от структуры исходного варианта E1 дикого типа (см. рис. 3, № 10). Трехмерные структуры различных вариантов мутантного белка демонстрируют различия в конфигурациях форм молекул, лишенных одного или более сайтов гликозилирования.

Образующийся в результате процессинга и последующего гликозилирования белок E1 встраивается в мембрану, где происходит его сворачивание и образование комплекса E1E2, участвующего в формировании инфекционных вирусных частиц [7, 8]. В предыдущем сообщении [1] мы показали, что отсутствие углеводных цепей в определенных сайтах гликозилирования E1, в частности N1 или N5, приводит к неправильному сворачи-

ванию белков и образованию непродуктивных комплексов E1mutE2, что, в свою очередь, ведет к образованию дефектных вирусных частиц. Как видно из рис. 3, смоделированные пространственные структуры этих белков совпадают (№ 1, № 2 и № 3), существенно отличаясь при этом от структуры белка дикого типа (№ 10), содержащего все углеводные цепи. Таким образом, данные моделирования также свидетельствуют в пользу того, что гликаны, связанные с сайтами N1 и N5, играют наиболее существенную роль в придании E1 правильной формы, необходимой для образования комплекса E1E2. В то же время, при синтезе мутантных белков E1, лишенных трех сайтов гликозилирования N2, N3, N4 или одного из них, в клетках насекомых формируется продуктивный комплекс E1E2, хотя и с меньшей эффективностью, чем в случае экспрессии E1 дикого типа. Форма молекулы E1 (№ 4), лишенной этих сайтов, представленная на рис. 3, приближается по форме к белку дикого типа (№ 10). Однако, отсутствие этих трех сайтов гликозилирования N2, N3, N4 и дополнительных гликанов в сайтах N1 или N5 E1, влияет на конфигурацию формы молекул белка E1 (№ 5, № 6, № 8), существенно отличающихся от формы молекул белка дикого типа (№ 10). Структура белка с дополнительным сайтом гликозилирования N6 (№ 9), представленная на рис. 3, практически не отличается от структуры E1 дикого типа (№ 10), что также соответствует нашим экспериментальным данным, согласно которым введение в E1 дополнительного сайта гликозилирования N6 не влияет на сборку комплекса E1E2.

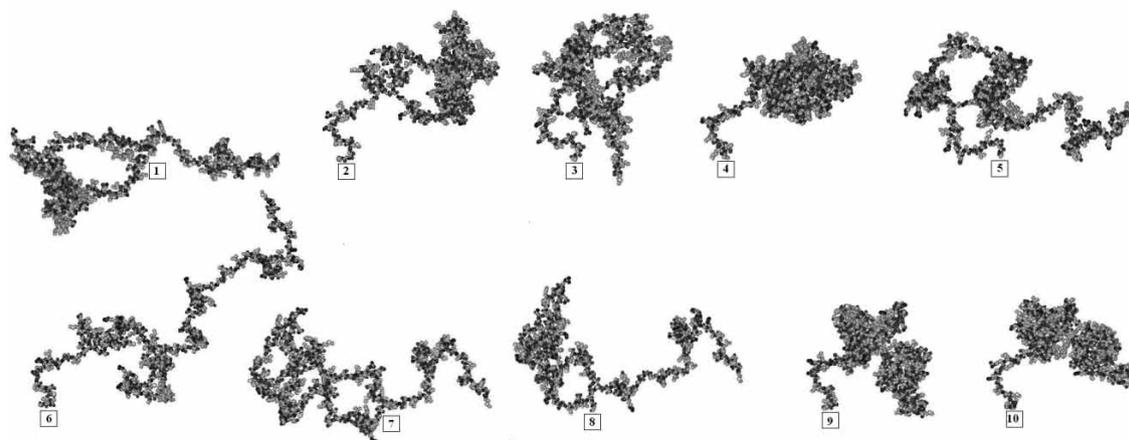


Рис. 3. Компьютерная модель трехмерной структуры белка E1 ВГС с мутациями. Мутантные варианты гликопротеина E1 с нарушенными сайтами гликозилирования (N1- N6): 1 – N1; 2 – N5; 3 – N1 и N5; 4 – N2, N3 и N4; 5 – N2, N3, N4 и N5; 6 – N1, N2, N3 и N5; 7 – N1- N5; 8 – N1, N2, N3 и N4; 9 – с введенным дополнительно сайтом гликозилирования N6; 10 – исходный вариант E1 дикого типа. № – место прикрепления белка E1 к мембране. Белок E1 ориентирован таким образом, чтобы [А] располагался в нуле оси Oy, а [N] лежал в плоскости рисунка или в плоскости Oxy.

Заключение

Таким образом, трехмерные модели структуры белка E1 с мутациями показывают, что N-связанные гликаны оказывают непосредственное влияние на сворачивание E1, на форму молекулы и, по-видимому, могут играть определенную роль в функционировании этих белков. Данные молекулярного моделирования, полученные в настоящей работе, в целом соответствуют экспериментальным данным, полученным нами ранее [1].

По нашему мнению, комбинации экспериментальных и расчетных подходов могут быть использованы в дальнейших исследованиях, связанных с эффектом мутаций гликопротеинов на репликацию вируса, секрецию вирусных частиц, с ролью отдельных гликанов гликопротеинов ВГС во взаимодействии с рецепторами клетки и проникновении вируса в клетку.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований 08-04-00281, 011-04-00231.

Литература

1. Орлова О. В., Друца В. Л., Спирин П. В. и соавт. Роль N-гликанов гликопротеина E1 вируса гепатита С в процессе сборки структурных белков вируса и формировании вирусных частиц. Молекул биол 2013; 47(1):147-56.
2. Dubuisson J., Rice C. M. Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. J Virol 1996; 70:778-86.
3. Jones D. M., McLauchlan J. Hepatitis C Virus: Assembly and Release of Virus Particles. J Biol Chem 2010; 285:22733-9.
4. Chapel C., Garcia C., Roingeard Ph., et al. Antiviral effect of α -glucosidase inhibitors on viral morphogenesis and binding properties of hepatitis C virus-like particles. J Gen Virol 2006; 87:861-71.
5. Helle F., Goffard A., Morel V., et al. The Neutralizing Activity of Anti-Hepatitis C Virus Antibodies Is Modulated by Specific Glycans on the E2 Envelope Protein. J Virol 2007; 81:8101-11.
6. Xiang J., Wunschmann S., George S. L., et al. Recombinant hepatitis C virus-like particles expressed by baculovirus: utility in cell-binding and antibody detection assays. J Med Virol 2002; 68:537-43.
7. Trombetta E. S. The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. Glycobiology 2003; 13 (9):77R-91R.
8. Tramontano A. The role of molecular modelling in biomedical research. FEBS Lett 2006; 580:928-34.
9. Granovsky A. A. Presentation on the large-scale QC and QM/MM modeling using PC GAMESS 2006. Available at URL: <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/largescale.pdf>
10. Granovsky A. A. FIREFLY Quantum Chemistry Package, version 7.1.G. Available at URL: <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>
11. Granovsky A. A. Presentation on efficient strategy for summation of PT series in MCQDPT2 and XMCQDPT2 implementation 2010. Available at URL: <http://phys148-1.chem.msu.ru/gran/gamess/qdpt2.pdf>
12. Schueler-Furman O., Wang C., Bradley P., Misura K., Baker D. Progress in modeling of protein structures and interactions. Science 2005; 310:638-42.
13. Ginalski K. Comparative modeling for protein structure prediction. Curr Opin Struct Biol 2006; 16:172-7.
14. Qian B., Ortiz A. R., Baker D. Improvement of comparative model accuracy by free-energy optimization along principal components of natural structural variation. Proc Natl Acad Sci 2004; 101:15346-51.
15. Xu Y., Purkayastha P., Gai F. Nanosecond folding dynamics of a three-stranded beta-sheet. J Am Chem Soc 2006; 128:15836-42.
16. Chugunov A. O., Chavatte P., Farce A., Efremov R. G. Differences in binding sites of two melatonin receptors help to explain their selectivity to some melatonin analogs: a molecular modeling study. J Biomol Struct Dynamics 2006; 24:91-108.
17. Dill K. A., Ozkan S. B., Weikl T. R., Chodera J. D., Voelz V. A. The protein folding problem: when will it be solved? Curr Opin Struct Biol 2007; 17:342-6.
18. Шайтан К. В., Терёшкина К. Б. Молекулярная динамика белков и пептидов (методическое пособие) М.: Ойкос. 2004, 103с.
19. Львов Д. К., Самохвалов Е. И., Селиванов Н. А., Мохонов В. В., Новиков Д. В., Прилипов А. Г., Шталов А. Г. Анализ генома изолята 274933RU вируса гепатита С, выделенного на территории Российской Федерации. Вопросы вирусологии 2002; 47(1):9-12.