

ДИЗАЙН ВАКЦИННОГО ПЕПТИДА ИЗ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ПТИЧЬЕГО ГРИППА H5N6

Хрусталёв В.В.

к. б. н., доцент, заведующий кафедрой
общей химии учреждения образования «Белорусский
государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь
vkhrustalev@mail.ru;

Хрусталёва Т.А.

к. б. н., учёный секретарь
государственного научного учреждения
«Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск,
Беларусь
tanissia.lir@gmail.com

Статья посвящена поиску структурно стабильного консервативного эпитопа нейраминидазы вируса птичьего гриппа H5N6. Проведён анализ единственной трёхмерной структуры нейраминидазы данного штамма вируса гриппа в сравнении с таковой для пандемического вируса свиного гриппа H1N1. Использован оригинальный алгоритм PentaFOLD 3.0 для поиска структурно устойчивых элементов вторичной структуры. В качестве перспективного вакцинного пептида предложен таковой, соответствующий бета-шпильке с консервативной поверхностью, экспонированной внутрь полости, содержащей активный центр фермента.

Ключевые слова: нейраминидаза; вирус гриппа H5N6; вирус гриппа H1N1; вторичная структура; вакцинный пептид

THE DESIGN OF THE VACCINE PEPTIDE FROM THE AVIAN INFLUENZA H5N6 VIRUS NEURAMINIDASE

Khrustalev V.V.

Candidate of Biology, Associate Professor, Head of the Department
of General Chemistry of the Educational Institution
«Belarusian State Medical University», Minsk, Belarus
vkhrustalev@mail.ru;

Khrustaleva T.A.

Candidate of Biology, Scientific Secretary
of the State Scientific Institution «Institute of Physiology
of the National Academy of Sciences of Belarus», Minsk, Belarus
tanissia.lir@gmail.com

The article is on the search of the structurally stable and conserved epitope of avian flu H5N6 virus neuraminidase. The analysis of the only one known three-dimensional structure of that Influenza strain has been performed in comparison with

the same protein from the pandemic swine flu H1N1 strain. The original algorithm PentaFOLD 3.0 has been used for the detection of structurally stable elements of secondary structure. As the most promising vaccine peptide we have suggested the one that corresponds to the beta-hairpin with conserved surface that is exposed inside the cavity containing an active center of the enzyme.

Key words: neuraminidase; H5N6 Influenza virus; H1N1 Influenza virus; secondary structure; vaccine peptide

Иммунная система имеет свойство запоминать антигенные детерминанты. Одно из свойств иммунологической памяти поэтически назвали «первородным антигенным грехом» (по англ.: original antigenic sin) [1]. Получается, что в ответ на инфекцию новым штаммом вируса в гораздо большем количестве вырабатываются антитела к консервативным эпитопам, а не к тем, которые имеют иную структуру по сравнению с таковыми у штамма вируса, когда-то впервые заразившего данного человека [2]. Новые клоны В-лимфоцитов не развиваются так хорошо, как клоны клеток памяти, в которых гены специфических антител уже сформировались. Далее в клонах «пробуждённых» клеток памяти продолжается мутагенез, приводящий к отбору мутаций, повышающих сродство «старых» антител к «обновлённым», но консервативным эпитопам.

Информацию о «первородном антигенном грехе» необходимо использовать в подготовке к борьбе с возможными новыми эпидемиями. Серьёзную опасность представляют штаммы птичьего гриппа, которые ещё не смогли адаптироваться к человеческой популяции, но в любой момент могут полностью преодолеть межвидовой барьер. Одним из таких опасных патогенов является вирус птичьего гриппа H5N6, который уже неоднократно передавался от птиц к человеку, но не смог распространиться внутри человеческой популяции [3]. Вакцина против такого возбудителя должна быть основана на эпитопах, которые консервативны настолько, чтобы гены антител, выработанные к человеческим штаммам вируса гриппа (в том числе – к пандемическому штамму H1N1, включённому в вакцины), смогли легко адаптироваться к H5N6.

Как показали наши исследования [4], залогом успеха в деле создания новых вакцинных пептидов является стабильность их вторичной структуры. При этом стабильные элементы вторичной структуры должны быть в достаточной степени доступны для контакта с антителами – быть экспонированными водному микроокружению.

Целью работы послужил дизайн вакцинного пептида из нейраминидазы вируса птичьего гриппа H5N6 на основании следующих критериев: консервативности его аминокислотной последовательности, стабильности его вторичной структуры и доступности его эпитопов водному микроокружению.

Материалы и методы. Материалом для исследования явились трёхмерные структуры нейраминидазы вируса птичьего гриппа H5N6

(идентификатор в Protein Data Bank: 5HUM) [5] и пандемического свиного гриппа H1N1 (PDB ID: 6Q23) [6]. Аминокислотные последовательности нейраминидаз этих вирусов были выровнены друг с другом с помощью программы MEGA X. Вторичная структура была определена с помощью метода DSSP, так же как и степень экспонированности аминокислотных остатков растворителю (воде). Стабильность элементов вторичной структуры оценивали оригинальным вероятностным методом, включённым в алгоритм PentaFOLD 3.0 [4].

Результаты. При сравнении трёхмерных структур на рисунке нельзя не отметить, что вторичная структура нейраминидазы не столь стабильна: как у вируса птичьего гриппа H5N6 (рисунок 1б), так и у пандемического вируса «свиного» гриппа H1N1 (рисунок 1а). На последней структуре заметны три экспонированных водному окружению стабилизированных бета-тяжа. Следует уточнить, что строение надмембранного домена нейраминидазы описывается как «бета-пропеллер с шестью лопастями». Каждая такая лопасть состоит из четырёх бета-тяжей, и только один из них расположен на поверхности белка. В центре «пропеллера» расположена полость, на краях которой располагаются аминокислотные остатки, формирующие активный центр [6]. Антитела, блокирующие активный центр, могут обладать нейтрализующей активностью за счёт подавления способности вируса открепляться от своих собственных рецепторов на заражённой клетке путём разрушения α -кето-связи между концевой N-ацетилнейраминовой кислотой и соседним углеводным остатком на рецепторе (сиаловой кислоте), образовавшем комплекс с вирусным гемагглютинином. Помимо этого, антитела к нейраминидазе могут вызывать антитело-индуцированную цитотоксичность, распознавая клетки, экспрессирующие вирусные белки на поверхности цитоплазматической мембраны.

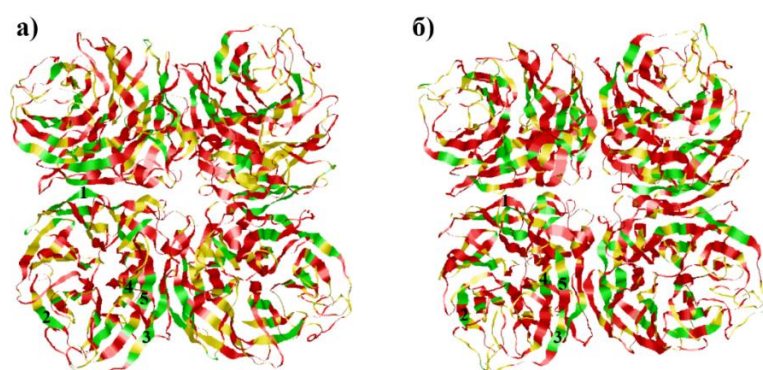


Рисунок. Результаты работы алгоритма PentaFOLD 3.0 над трёхмерными структурами нейраминидазы вируса гриппа H1N1 (а) и H5N6 (б). Стабильные фрагменты элементов вторичной структуры обозначены зелёным, мета-стабильные – жёлтым, нестабильные – красным; цифрами 1 – 5 обозначены обсуждаемые в тексте бета-тяжи

Ниже приведено сравнение трёх структурно стабильных бета-тяжей между нейраминидазой вирусов гриппа H1N1 и H5N6.

Бета-тяж 210-ITDT-214 у H1N1 является полностью стабильным (обозначен цифрой 1 на рисунке), но ему у H5N6 соответствует бета-тяж 132-RPVTEIP-138, в котором только один остаток является мета-стабильным, а все остальные – нестабильными. При сохранении практически идентичной вторичной структуры, сходство между аминокислотными последовательностями этих бета-тяжей практически отсутствует.

Бета-тяж 312-YQIGY-316 у H1N1 включает два мета-стабильных остатка и три стабильных (обозначен цифрой 2 на рисунке). Бета-тяж 233-THTSKY-238 у H5N6 включает три стабильных остатка, один мета-стабильный и всего два нестабильных. Несмотря на то, что эти два относительно стабильных бета-тяжа соответствуют друг другу на трёхмерных структурах N1 и N6, антитела к одному из них точно не смогут распознать другой по причине отсутствия сходства в аминокислотных последовательностях.

Длинный бета-тяж 392-IKQDIVGINEW-403 у H1N1 включает пять стабильных, три мета-стабильных и только три нестабильных С-концевых остатка (обозначен цифрой 3 на рисунке). Ему соответствует бета-тяж 314-SHQIVNNQNW-324 у H5N6, в котором три остатка стабильны, один мета-стабилен, а остальные семь являются нестабильными. Хотя четыре остатка в этих бета-тяжах консервативны (выделены жирным подчеркнутым шрифтом), вероятность воспроизведения вторичной структуры для бета-тяжа из N6 низка, так как образующий с ним бета-шпильку бета-тяж крайне нестабилен.

Помимо бета-тяжей, иммуногенными в составе пептида могут быть и петли. Однако для воспроизведения своей структуры петле желательно находиться между двумя стабильными бета-тяжами и быть достаточно консервативной. Консервативным фрагментом обладает петля 430-RPKENTIW-438, «нависающая» над активным центром нейраминидазы H1N1. Ей соответствует петля 353-RPKESSVLW-361 фермента вируса штамма H5N6. Бета-тяж, обращённый «внутри» полости, образующей активный центр нейраминидазы (обозначен цифрой 4 на рисунке), ещё более консервативен: 419-RPCFWVELIRG-429 у H1N1 и 344-CFYVELIRG-352 у H5N6. Второй бета-тяж в шпильке (обозначен цифрой 5 на рисунке) имеет менее консервативную аминокислотную последовательность: 439-TSGSSISFCGV-449 у H1N1 и 362-TSNSIVALCGS-372 у H5N6.

В целом вся бета-шпилька, образованная бета-тяжами, обозначенными цифрами 4 и 5 на рисунке, у H1N1 включает девять стабильных остатков и девять мета-стабильных, бета-шпилька у H5N6 включает шесть стабильных и девять мета-стабильных остатков. У нейраминидаз обоих штаммов вируса между этими бета-тяжами существуют не только водородные связи и гидрофобные взаимодействия, но и дисульфидная связь. В связи с этим целесообразным представляется синтез вакцинного пептида с дисульфидной связью между N-концевым и С-концевым остатками цистеина, соответствующего фрагменту

нейраминидазы H5N6 с аминокислотной последовательностью: CFYVELIRGRPKESSVLWTSNSIVALC. Этот пептид (сокращённо – CC27) также можно будет конъюгировать с белком-носителем через сульфгидрильные группы концевых остатков цистеина.

Можно рассчитывать на то, что иммунизация пептидом CC27 заставит «проснуться» В-клетки, содержащие гены, кодирующие антитела, выработанные к линейному эпитопу «IRGRPKE», экспонированному водному окружению, общему для обоих типов нейраминидазы. Перспективным в плане «пробуждения» ранее выработанных клонов В-клеток является и линейный эпитоп «WTSNS», расположенный у основания петли, также доступный растворителю, образующий конформационный эпитоп с упомянутой выше последовательностью. Антитела, способные распознать этот эпитоп, могут быть способными к стерическому блокированию активного центра нейраминидазы, тем самым препятствуя работе фермента. Нельзя не отметить, что известны несколько трёхмерных структур комплексов нейраминидазы с антителом, в которых фрагмент последнего взаимодействует с интересующей нас областью, закрывая активный центр фермента (PDB ID: 6Q23, 6LXI, 6LXJ, 6LXK, 6PZE, 6V4N). На этих структурах одна из петель антиген-связывающего домена антитела «врывается» внутрь полости, образующей активный центр нейраминидазы [7].

Заключение. Осуществлён дизайн вакцинного пептида из нейраминидазы птичьего вируса гриппа H5N6. Его аминокислотная последовательность: CFYVELIRGRPKESSVLWTSNSIVALC.

Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ № X22КИ-022.

Список литературы

1. From original antigenic sin to the universal influenza virus vaccine / C. Henry [et al.] // Trends. Immunol. – 2018. – Vol. 39. – P. 70-79.
2. Human germinal centres engage memory and naive B cells after influenza vaccination / J. S. Turner [et al.] // Nature. – 2020. – Vol. 586. – P. 127-132.
3. Human exposures to H5N6 avian Influenza, England, 2018 / A. C. Thornton [et al.] // J. Infect. Dis. – 2019. – Vol. 220. – P. 20-22.
4. Khrustalev, V. V. The PentaFOLD 3.0 algorithm for the selection of stable elements of secondary structure to be included in vaccine peptides / V. V. Khrustalev // Protein Pept. Lett. – 2021. – Vol. 28. – P. 573-588.
5. Molecular characterizations of surface proteins hemagglutinin and neuraminidase from recent H5Nx avian Influenza viruses / H. Yang [et al.] // J. Virol. – 2016. – Vol. 90. – P. 5770-5784.
6. Broadly protective human antibodies that target the active site of influenza virus neuraminidase / D. Stadlbauer [et al.] // Science. – 2019. – Vol. 366. – P. 499-504.

7. Structure-based modification of an anti-neuraminidase human antibody restores protection efficacy against the drifted Influenza virus / H. Jiang [et al.] // mBio. – 2020. – Vol. 11. – P. 2315-2320.