

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ  
УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ  
«ИНСТИТУТ БИОХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 577.112.6+571.27

**ХРУСТАЛЁВ**  
**Владислав Викторович**

**СТАБИЛЬНОСТЬ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ  
И ВАКЦИННЫХ ПЕПТИДОВ**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

по специальности 03.01.04 – биохимия

Гродно 2021

Работа выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет»

**Научный консультант:** **Стожаров Александр Николаевич**, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры радиационной медицины и экологии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

**Официальные оппоненты:** **Мойсеёнок Андрей Георгиевич**, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, главный научный сотрудник республиканского научно-исследовательского унитарного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси»

**Слобожанина Екатерина Ивановна**, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, главный научный сотрудник государственного научного учреждения «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси»

**Титовец Эрнст Петрович**, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии»

**Оппонирующая организация:** учреждение образования «Витебский государственный университет имени П. М. Машерова».

Защита состоится 3 декабря 2021 г. в 11 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 01.30.01 при республиканском научно-исследовательском унитарном предприятии «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 230023, г. Гродно, пл. Антония Тызенгауза, 7, e-mail: office\_ibbas@mail.ru, тел/факс (0152) 55-90-75.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке республиканского научно-исследовательского унитарного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси».

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ ноября 2021 г.

Ученый секретарь  
совета по защите диссертаций  
кандидат биологических наук



И. П. Сутько

## ВВЕДЕНИЕ

Проблема повышения качества вакцин постоянно актуальна для биологической и медицинской науки по причине периодического возникновения новых эпидемий и пандемий. Помимо известной проблемы, связанной с уходом возбудителей от иммунного ответа за счёт возникновения мутаций, остро встаёт и проблема «таргетности» вырабатываемого иммунного ответа. Так, антитела к вирусу иммунодефицита человека 1 типа вырабатываются в высоком титре вскоре после заражения или иммунизации [Maug L. et al., 2017], но те антитела, которые действительно способны остановить распространение вируса в организме, появляются лишь у некоторых инфицированных через десятки лет после начала инфекционного процесса [Wu X. et al., 2015].

Обеспечить выработку протективных антител представляется возможным путём иммунизации синтетическими пептидами – точечными мишенями к самым уязвимым фрагментам белков вирусов и бактерий [Skwarczynski M., Toth I., 2016]. Известно, что прервать инфекционный процесс можно как минимум на трёх этапах: на этапе прикрепления инфекционного агента к рецептору, в момент проникновения его внутрь цитоплазмы, в период накопления вирусных частиц внутри инфицированной клетки. Существует острая необходимость в методе, с помощью которого можно будет сделать аргументированный выбор в пользу одной из этих стратегий ещё на первых биоинформатических этапах работы над созданием вакцины, таким образом сэкономив средства на синтез пептидов и исследование их физико-химических и иммуногенных свойств.

Известно, что такие фрагменты белков, как экспонированные растворителю петли, богатые бета-поворотами, обладают высокой иммуногенностью [Jespersen et al., 2017], но их третичная структура, как правило, не воспроизводится в составе коротких пептидов, в отличие от структуры фрагментов белков, содержащих стабильные элементы вторичной структуры: альфа-спирали и бета-тяжи.

В этой связи представляется целесообразным создание метода определения степени стабильности элементов вторичной структуры белков, её воспроизводимости в коротких пептидах. В процессе создания такого метода должны быть раскрыты ранее неизвестные механизмы формирования вторичной структуры, в том числе во время ко-трансляционного фолдинга [Saunders R. et al., 2011]. Поиск общих закономерностей осложнён тем, что аминокислотный состав имеет существенные особенности у белков разных структурных классов [Барковский Е. В., 1985] и у белков, кодируемых генами с разной GC-насыщенностью [Sueoka N., 1961; Du M. Z. et al., 2018], некоторые особенности характерны и для белков прокариот по сравнению с белками эукариотических организмов [Gaur R. K., 2009].

Важным с практической точки зрения является решение вопроса о том, каким способом лучше воспользоваться для иммунизации короткими пептидами: введением самих пептидов с соответствующим адъювантом или использованием ДНК- или РНК-вакцины [Титов Л. П., 2002]. Зная направление и частоту возникновения замен в определённом векторе, можно максимально сократить вероятность несинонимичных замен в трангене [50]. Однако такие меры лишь отсрочат наступление момента, после которого ДНК- или РНК-вакцина перестанет вырабатывать именно тот антиген, для иммунизации которым она была разработана, так как азотистые основания подвергаются как спонтанным процессам окисления и дезаминирования [Risso-Ballester J. et al., 2016], так и ферментативным [Roth S. H. et al., 2019]. Чем интенсивней экспрессируется ген, тем выше частота возникновения определённых мутаций в нём, что справедливо как для естественных, так и для искусственных генетических конструкций [29].

Диссертация посвящена решению проблемы отбора фрагментов белков для создания на их основе эффективных синтетических вакцин. В качестве концепции работы выступает утверждение о том, что с помощью вероятностного алгоритма можно определить степень структурной стабильности элементов вторичной структуры белка, а следовательно, вероятность воспроизведения конформации, присущей фрагменту полноразмерного белка, в коротком пептиде [4]. Концептуальное развитие получает понятие о стабильности элементов вторичной структуры белка, благодаря чему на новый уровень выходит такое научное направление, как разработка синтетических вакцин.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Связь работы с научными программами (проектами), темами**

Диссертационная работа выполнена в рамках тем НИР «Мутационное давление в генах и геномах» (номер гос. регистрации 20110619; сроки выполнения 01.01.2011–31.12.2015) и «Стабильность вторичной структуры белков» (номер гос. регистрации 20160477; сроки выполнения 01.01.2016–31.12.2020) кафедры общей химии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (БГМУ); в рамках гранта Президента Республики Беларусь по науке (2016); грантов БРФФИ Б16М-083 «Влияние ионов марганца (II) на структуру прионного белка человека» (номер гос. регистрации 20162776; сроки выполнения 01.06.2016–31.03.2018) и БРФФИ–РФФИ Б18Р-113 «Поиск новых способов блокады проникновения вируса гриппа в клетку на этапе слияния мембран и дезинтеграции матрикса» (номер гос. регистрации 20181247; сроки выполнения 01.06.2018–31.03.2020).

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 годы: п. 2 «Химический синтез и продукты», п. 3 «Биологические системы и технологии», п. 4 «Медицина и фармацевция», а также приоритетным направлениям научно-технической деятельности Республики Беларусь на 2016–2020 годы: п. 4 «Медицина, фармацевция, медицинская техника: технологии профилактики, лечения заболеваний, медицинские биотехнологии», п. 5 «Химические технологии, нефтехимия: производство новых химических продуктов», п. 7 «Информационно-коммуникационные и авиакосмические технологии: биоинформатика и информационные технологии в медицине».

Тема диссертации соответствует п. 2 приоритетных направлений научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы: «системная и синтетическая биология; диагностика, медицинская профилактика и лечение инфекционных, включая вирусной этиологии, и неинфекционных заболеваний, экспертиза качества медицинской помощи».

#### **Цель и задачи исследования**

**Цель исследования** – установить закономерности стабилизации альфа-спиралей, бета-тяжей и петель в молекулах белков и разработать на этой основе метод отбора эпитопов для создания пептидных вакцин.

#### **Задачи исследования:**

1. Выявить закономерности распределения аминокислотных остатков по элементам вторичной структуры и степени их экспонированности водному окружению в зависимости от типа граничащих с ними элементов вторичной структуры, общие для белков разных структурных классов, кодируемых генами с различной GC-насыщенностью. На основании выявленных закономерностей создать метод отбора фрагментов белков с наиболее стабильной вторичной структурой и применить его к поверхностному белку gp120 вируса иммунодефицита человека 1 типа, дифтерийному токсину, гемагглютинирующему вирусу гриппа H1N1, прионному белку человека.

2. Установить вторичную структуру пептидов, соответствующих наиболее стабильным фрагментам поверхностного белка gp120 вируса иммунодефицита человека 1 типа, дифтерийного токсина, гемагглютинирующего вируса гриппа H1N1 путём применения серии физико-химических исследований, включающих спектроскопию кругового дихроизма и комбинационного рассеяния, анализ структурных переходов при повышении температуры под контролем спектрофлуориметрии.

3. Сконструировать пептид, соответствующий наименее стабильному фрагменту прионного белка человека, получить конъюгат этого пептида с бычьим сывороточным альбумином, установить вторичную структуру пептида и его конъюгата с бычьим сывороточным альбумином с помощью

спектроскопии кругового дихроизма, анализа структурных переходов при повышении температуры под контролем спектрофлюориметрии, проверить способность кроличьих антител к рекомбинантному прионному белку человека к связыванию с пептидом.

4. Для проверки иммуногенности разработанных пептидов и оценки способности полученных антител к связыванию с полноразмерными белками провести иммунизацию лабораторных животных пептидами, соответствующими наиболее стабильным фрагментам поверхностного белка gp120 вируса иммунодефицита человека 1 типа, дифтерийного токсина, гемагглютинина вируса гриппа H1N1, конъюгатом пептида, соответствующего наименее стабильному фрагменту прионного белка человека с бычьим сывороточным альбумином.

5. Оценить перспективность создания ДНК- и РНК-вакцин, кодирующих вакцинные пептиды, на основе анализа факторов, влияющих на интенсивность и направление мутационного давления, возникающего во время транскрипции в генах прокариот, эукариот и вирусов, во время трансляции – в геномах вирусов, представленных РНК-плюс цепями.

Объекты исследования: трёхмерные структуры белков, представителей всех структурных классов, протеомов эукариот и бактерий с различной степенью GC-насыщенности геномов; синтетические пептиды, соответствующие наиболее стабильным фрагментам гемагглютинина вируса гриппа H1N1, дифтерийного токсина, поверхностного белка gp120 вируса иммунодефицита человека 1 типа, пептид, соответствующий наименее стабильному фрагменту прионного белка человека, его конъюгат с бычьим сывороточным альбумином; нуклеотидные последовательности геномов различных штаммов вируса гриппа H1N1, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae* и генов, кодирующих белок APC, рецептор эпидермального фактора роста, глюкокиназу, фосфофруктокиназу, гексокиназы человека и позвоночных, а также генов и геномов вирусов Эбола, Марбург, Зика и парвовируса B19, аденоассоциированных вирусов, коронавирусов.

Предмет исследования: факторы, обеспечивающие стабильность структуры белка на уровне первичной, вторичной, третичной и четвертичной структуры; физико-химические, антигенные и иммуногенные свойства пептидов, соответствующих наиболее стабильным фрагментам поверхностного белка gp120 вируса иммунодефицита человека 1 типа, дифтерийного токсина, гемагглютинина вируса гриппа H1N1; пептида, соответствующего наименее стабильному фрагменту прионного белка человека, его конъюгата с бычьим сывороточным альбумином.

**Научная новизна.** Несмотря на наличие обширных сведений о факторах, детерминирующих формирование вторичной структуры белка, исследования по оценке влияния на её формирование фланкирующих элементов вторичной

структуры ранее не проводились. Метод выявления фрагментов белков с наиболее стабильной вторичной структурой уникален по причине использования оригинальных вероятностных шкал и сведений о дипептидном составе наиболее стабильных типов элементов вторичной структуры.

Является новой концепция об использовании вероятностных методов предсказания вторичной структуры для оценки стабильности каждого отдельно взятого её элемента.

Синтетические пептиды, предложенные в работе, являются оригинальными.

Сведения о преобладающих направлениях мутагенеза в генах, кодирующих рецептор эпидермального фактора роста, белок APC, гексокиназы, глюкокиназу, фосфофруктокиназу человека и позвоночных животных, в геномах бактерий *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae*, в геномах вирусов Эбола, Марбург, Зика, парвовируса B19, вируса гриппа H1N1, аденоассоциированных вирусов, коронавирусов, включая SARS-CoV-2, ранее не были известны мировой научной общественности.

Впервые получены новые знания об особенностях жизненных циклов перечисленных выше вирусов и бактерий, что оказалось возможным сделать по результатам изучения основных направлений мутагенеза в их генах.

Впервые оценён вклад перечисленных ниже причин в возникновение локальных отклонений от общего направления мутационного давления в гене: наличия альтернативных промоторов и терминаторов транскрипции, генов микроРНК, присутствия G-квадруплексов и других элементов вторичной структуры в одноцепочечной РНК и ДНК, групп редких кодонов непосредственно в кодирующих участках генов и на комплементарных им цепях.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. В процессе эволюции белков в наибольшей степени закрепились комбинации аминокислотных остатков, стабилизирующие структуру петель между двумя бета-тяжами, бета-тяжей между двумя альфа-спиралями, альфа-спиралей между двумя бета-тяжами, альфа-спиралей между альфа-спиралями и бета-тяжами. Такие комбинации обуславливают пониженную доступность водному микроокружению и склонность к формированию ядра белка для бета-тяжей, расположенных между двумя альфа-спиралями, петель и альфа-спиралей, расположенных между бета-тяжами и альфа-спиралями.

2. Вторичная структура оригинальных пептидов NY25, SF23 и NQ21 аналогична таковой для соответствующих фрагментов гемагглютинаина вируса гриппа H1N1, дифтерийного токсина, белка gp120 вируса иммунодефицита человека 1 типа, так как NY25 обладает стабильным фрагментом альфа-спирали и стабильным бета-тяжом, SF23 содержит стабильный бета-тяж, NQ21 содержит стабильную альфа-спираль.

3. Наименее структурно устойчивым участком альфа-спирального домена прионного белка человека является фрагмент, соответствующий пептиду СС36, который формирует бета-структуру, находясь в восстановленном состоянии, с дисульфидной связью и в форме конъюгата с бычьим сывороточным альбумином. В пептиде СС36 воспроизведена структура эпитопа патологической формы прионного белка человека.

4. Пептиды NY25, SF23 и NQ21 существуют в форме олигомеров и обладают иммуногенными свойствами. Антитела к этим пептидам образуют устойчивые комплексы с полноразмерным гемагглютинином вируса гриппа H1N1, дифтерийным токсином, белком gp120 вируса иммунодефицита человека 1 типа.

5. Частота и соотношение разных типов нуклеотидных мутаций зависят от времени пребывания фрагмента ДНК в одноцепочечном состоянии во время транскрипции, фрагмента вирусной РНК – во время транскрипции и трансляции, и от его способности образовывать вторичную структуру. Это обуславливает различия в направлении и силе мутационного давления как между генами, так и между их фрагментами у эукариот, бактерий и вирусов.

**Личный вклад соискателя.** Формирование выборок, обработка с помощью алгоритма DSSP и анализ информации о трёхмерных структурах белков, создание алгоритма PentaFOLD 3.0 осуществлено соискателем лично (личное участие – 100%) на базе кафедры общей химии БГМУ. Работа по записи и анализу спектров кругового дихроизма синтетических пептидов была проведена соискателем совместно с канд. физ.-мат. наук, зав. лабораторией гемопротеидов НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова Арутюняном А. М. (личное участие – 80%). Исследовательская работа по записи спектров температурного тушения флюоресценции синтетических пептидов и обработке полученных результатов, по проведению аффинной очистки сывороток лабораторных животных проведена автором совместно с канд. биол. наук, зав. многопрофильной диагностической лабораторией ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» Хрусталёвой Т. А. (личное участие – 70%). Иммунизация лабораторных животных осуществлена в виварии БГМУ (личное участие – 100%). Анализ нуклеотидных последовательностей генов и геномов эукариот, бактерий и вирусов на предмет определения в них направления мутационного давления, а также поиска в них регуляторных последовательностей проведен соискателем лично (личное участие – 100%) на базе кафедры общей химии БГМУ.

Результаты исследования опубликованы в двух статьях без соавторов [31, 34], в совместных статьях, в которых соавторы оказывали помощь в проведении экспериментов и интерпретации результатов (в [1, 2, 5, 8, 13, 17, 20, 22] личный вклад соискателя 90%, в [4, 6, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 21, 23, 25, 26, 27, 29, 32] – 80%,

в [3, 7, 19, 35] – 70%). В некоторых публикациях автором выполнены отдельные этапы исследования (в [11, 18, 24, 28] личный вклад 40%, в [30, 33] – 30%).

Постановка целей и задач исследования, анализ полученных результатов, подготовка печатных работ к публикации проведена совместно с заведующим кафедрой общей химии БГМУ, доктором биологических наук, профессором Барковским Е. В. (18.05.1946–26.12.2015) и научным консультантом – профессором кафедры радиационной медицины и экологии БГМУ, доктором биологических наук, профессором Стожаровым А. Н.

**Апробация диссертации и информация об использовании её результатов.** Результаты исследований, включенные в диссертацию, доложены на зарубежных международных научных конференциях: Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'13) (Москва, РФ, МГУ, 25–28 июля 2013 г.), V International Congress on Analytical Proteomics (Капарика, Португалия, 3–6 июля 2017 г.), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине» (Санкт-Петербург, РФ, 3 декабря 2020 г.). Результаты диссертации обсуждены на конференциях в Республике Беларусь: Республиканской научно-практической конференции «Современные проблемы инфекционной патологии человека» (Минск, 12–13 ноября 2015 г.); научно-практической интернет-конференции молодых учёных «Инновации в медицине и фармации – 2015» (Минск, 7 декабря 2015 г.); сателлитной конференции молодых учёных «Фундаментальная наука в современной медицине» (Минск, 7 марта 2016 г.); I Белорусском биохимическом конгрессе «Современные проблемы биохимии» (Гродно, 5–6 июля 2016 г.); научной сессии БГМУ (Минск, январь 2014 г., 2015 г., 2018 г., 2019 г., 2021 г.); междисциплинарном круглом столе «Химия: инновации в медицине и фармацевтике» (Минск, 22 февраля 2017 г.); Белорусско-Польско-Литовском симпозиуме «Посттрансляционная модификация белков: механизмы, физиологическая и патогенетическая роль» (Гродно, 11–12 мая 2017 г.); III конференции молодых учёных биохимиков и молекулярных биологов с международным участием «Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии» (Гродно, 11–12 мая 2017 г.); II Белорусском биохимическом конгрессе «Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии» (Гродно, 17–18 мая 2018 г.); научно-образовательной конференции «ProBiology: молекулы жизни» (Витебск, 19 мая 2018 г.); Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» и съезде Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 27–29 июня 2018 г.; 17–19 июня 2020 г.); 1-й Белорусско-Польско-Литовской научной конференции «Границы биологических наук. Сигналинг и метаболизм», посвящённой

250-летию академика А. Снядецкого (Гродно, 8–9 ноября 2018 г.); Республиканской конференции с международным участием «Физико-химическая биология как основа современной медицины», посвящённой 110-летию В. А. Бандарина (Минск, 24 мая 2019 г.); Республиканской конференции с международным участием «Физико-химическая биология как основа современной медицины», посвящённой 80-летию со дня рождения профессора Т. С. Морозкиной (Минск, 29 мая 2020 г.).

Результаты работы внедрены в учебный процесс БГМУ и научный процесс ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии» (Минск, Республика Беларусь), ГНУ «Объединённый институт проблем информатики НАН Беларуси» (Минск, Республика Беларусь), НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова (Москва, Российская Федерация), ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (Москва, Российская Федерация).

**Опубликование результатов диссертации.** По материалам диссертации опубликовано 53 научные работы, в том числе 35 статей в рецензируемых научных журналах: 30 статей в иностранных рецензируемых журналах на английском языке (объёмом 15,13 авторского листа), 2 из них – без соавторов (объём 1,3 авторского листа), 5 статей в научных журналах Республики Беларусь (объёмом 1,78 авторского листа); 11 публикаций в материалах конференций; 7 тезисов докладов.

Общий объём опубликованных материалов по теме диссертации составил 16,91 авторского листа.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация состоит из перечня условных обозначений и сокращений, введения, общей характеристики работы, обзора литературы (Глава 1), материалов и методов (Глава 2), шести глав с анализом результатов собственных исследований (Главы 3–8), обсуждения полученных результатов (Глава 9), заключения (включающего основные научные результаты диссертации и рекомендации по практическому использованию результатов), библиографического списка (состоящего из списка использованных источников и списка публикаций соискателя) и приложения с актами внедрения результатов работы в научный и учебный процесс.

Полный объём диссертации составляет 253 страницы, из которых 170 страниц занимает машинописный текст; объём, занимаемый 79 рисунками, составляет 43 страницы, объём, занимаемый 7 таблицами, – 3 страницы; объём библиографического списка, содержащего 378 источников (31 русскоязычный и 347 англоязычных, включая 53 работы соискателя), составляет 28 страниц, объём приложения – 9 страниц.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы и методы исследования

В качестве материала для создания оригинального алгоритма PentaFOLD 3.0 использованы 1730 трёхмерных структур негомологичных друг другу белков из международной базы данных Protein Data Bank [Berman H. et al., 2003], представляющие собой 10 выборок: бактериальные белки (кодируемые генами с низкой, средней и высокой GC-насыщенностью), белки эукариотических организмов – представители четырёх структурных классов (преимущественно альфа-спиральные, преимущественно бета-структурные, белки класса «альфа + бета», белки класса «альфа/бета»), белки, связывающие катионы ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ). Химически синтезированным материалом для исследования явились высокоочищенные препараты пептидов. Биологическим материалом для исследования явились сыворотки крови кроликов до и после иммунизации пептидами.

В работе использованы следующие методы: твердофазный синтез пептидов, высокоэффективная жидкостная хроматография, аффинная хроматография, масс-спектрометрический анализ, спектроскопия кругового дихроизма (КД), спектрофлуориметрия, спектроскопия поверхностно-усиленного комбинационного рассеяния, спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) в инфракрасной области, оригинальные методы определения направления мутационного давления, алгоритм DSSP [Kabsch W., Sander C., 1983] для описания вторичной структуры белков и определения степени доступности аминокислотных остатков водному окружению, а также набор алгоритмов для моделирования трёхмерных структур белков, определения вторичной структуры нуклеиновых кислот, поиска регуляторных элементов в ДНК.

Полученные данные обрабатывали с помощью MS Excel, Past, SPSS, Statistica 10 и SigmaPlot 13.0 с использованием методов параметрической и непараметрической статистики.

### **Общие закономерности в аминокислотном составе и физико-химических свойствах двенадцати типов элементов вторичной структуры белков**

В работе используется оригинальная классификация элементов вторичной структуры [22]. Каждый элемент вторичной структуры («Н» – альфа-спираль, «В» – бета-тяж, «С» – петля) имеет четыре типа в зависимости от того, какие элементы вторичной структуры расположены до и после него в первичной (линейной) последовательности. Такая система, включающая 12 типов линейных фрагментов, позволила получить новые знания об архитектуре и эволюции белков, об их способности к связыванию с катионами металлов. На оригинальной «двенадцатеричной» системе, собственно, и основан оригинальный метод выявления наиболее стабильных элементов вторичной структуры, работающий в форме алгоритма PentaFOLD 3.0 [34].

В качестве интегрального показателя для сравнения белков из 10 выборок использовалась доля экспонированных растворителю остатков в каждом типе вторичной структуры [31].

Петли включают большое количество доступных растворителю остатков, бета-тяжи, наоборот, обогащены недоступными растворителю аминокислотными остатками, в то время как альфа-спирали включают предпочтительно экспонированные или недоступные растворителю остатки, но не частично экспонированные. Доля экспонированных остатков во фрагментах ВСН (в петлях между бета-тяжом и альфа-спиралью) достоверно ниже, чем в других типах петель, во всех 10 проанализированных выборках [31]. В среднем по всем выборкам доля недоступных растворителю остатков в ВСН составила  $29,50 \pm 0,91\%$ , в ВСВ –  $20,23 \pm 1,17\%$ , в НСН –  $19,31 \pm 1,00\%$ , в НСВ –  $21,13 \pm 0,27\%$ . Доля экспонированных остатков в бета-тяжах типа НВН (расположенных между двумя альфа-спиралями) имеет достоверно более низкое значение, чем в других типах бета-тяжей в 9 из 10 выборок, за исключением выборки альфа-спиральных белков, гидрофобные ядра которых не состоят из бета-структуры. В среднем по 10 выборкам достоверно снижен процент экспонированных остатков в альфа-спиралях типа ВНН (между бета-тяжом и альфа-спиралью) относительно остальных типов альфа-спиралей.

Особенности распределения экспонированных остатков по разным типам элементов вторичной структуры унаследованы (частично или полностью) белками всех структурных классов, вне зависимости от GC-насыщенности кодирующих их генов, от древних белков, сформировавших свою структуру, по всей видимости, на исходе эпохи «Мира РНК». Описанные выше тренды воспроизводятся на выборке, в которую вошли исключительно мономерные белки, и на выборке, в которую вошли только апоформы белков, без каких-либо лигандов. Нарушение выявленных закономерностей выявлено только в выборке белков, практически лишённых гидрофобных ядер, в которых доля недоступных растворителю остатков ниже 20%, а длина таких белков не превышает 250 остатков [31].

К остаткам, которые вносят свой вклад в снижение доступности растворителю фрагментов ВСН, относятся Gly, Pro, Cys, Arg, Glu, Asp, Gln, His, Ser, Thr, Asn и Lys. Петли типа ВСН можно уподобить «пещере с сокровищами», так как они являются достаточно гидрофильными, но располагаются, по крайней мере, частично, не на поверхности глобулы, а в углублениях. Гидрофильные функциональные группы из таких фрагментов петель должны взаимодействовать друг с другом в большей степени, чем с молекулами растворителя, по крайней мере, по сравнению с таковыми из петель других типов. Эти особенности петель ВСН обуславливают их предпочтительное вовлечение в связывание катионов металлов:  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Co^{2+}$  [14, 27]. Важно

подчеркнуть, что с этими фрагментами специфично связываются катионы металлов, но не такие органические молекулы, как этанол [20].

В бета-тяжах НВН все аминокислотные остатки демонстрируют достоверно сниженную доступность растворителю по сравнению с таковыми в других типах бета-тяжей, за исключением Trp, Met и Lys. Альфа-спирали ВНН имеют несколько сниженную доступность растворителю исключительно за счёт остатков Pro, Glu, Ser, Asn и Asp, которые предпочтительно формируют аминотерминальные участки альфа-спиралей [Aurora R., Rose G. D., 1998].

Средняя шкала, отражающая вероятность образования каждым пентапептидом, состоящим из гидрофильных (W) и гидрофобных (O) остатков, элементов вторичной структуры, была рассчитана на основании анализа 10 выборок белков. Все аминокислотные остатки при этом были разделены только на два класса согласно комбинированной шкале гидрофобности [Eisenberg et al., 1984]. Есть только два пентапептида, для которых нет предпочтительного структурного состояния: WWOOO и OOOOW.

Пентапептиды, преимущественно формирующие петли, отличаются своей гидрофильностью и отсутствием повторяющейся схемы чередования гидрофильных и гидрофобных остатков: WWWWW, OWWWW, WOWWW, WWWOW, WWWWO, OOWWW, WWWOO, OWOWW, WWOWO, OWWOW, WOWWO, OWWWO [5].

Пентапептиды, предпочтительно формирующие бета-тяжи, можно разделить на две группы: гидрофобные (OOOOO, WOOOO, OWOOO, OOOWO, OOOOW, WOOOW) и амфифильные с чередованием гидрофобных и гидрофильных остатков через один (WOWOW, OWOWO, WOWOO, OOWOW) [5].

Альфа-спиральные пентапептиды отличаются специфическим чередованием гидрофобных и гидрофильных остатков в стиле «два через два» (WOOWW, WWOOW, OWWOO, OOWWO), два через один (WWOWW, OOWOO) и переходами между ними (WOOWO, OWOOO) [5].

При сравнении аминокислотного состава всех четырёх типов петель друг с другом обнаружены следующие закономерности. Положительно заряженные Arg и Lys достоверно чаще используются в НСВ, чем во всех остальных типах петель [6]. Остатки Ser и Thr достоверно чаще встречаются в петлях ВСН, чем во всех остальных типах петель [6]. Петли НСН достоверно отличаются от всех остальных типов петель повышенными частотами Leu и Tyr [6]. В петлях ВСВ остатков Gly настолько же много, как в петлях НСВ, а остатков Asp настолько же много, как в петлях ВСН.

Наиболее выделяющимися по аминокислотному составу бета-тяжами являются НВН, так как в них достоверно чаще используется такой гидрофобный аминокислотный остаток, как Ile, и достоверно реже – гидрофильные Arg, Lys и Thr, по сравнению со всеми остальными типами бета-тяжей. Повышенная

гидрофильность бета-тяжей ВВВ обусловлена более высокой частотой использования остатков Glu, Gln и Ser относительно бета-тяжей НВН [22].

Анализ аминокислотного состава разных типов альфа-спиралей показал, что альфа-спирали типа ВНВ стабилизированы остатками Ala, а альфа-спирали типа ННВ стабилизированы остатками Arg [22]. Сравнение аминокислотного состава альфа-спиралей ННВ с таковым для альфа-спиралей ВНН также даёт основания для признания структуры ННВ более стабилизированной: частоты Arg, Glu и Gln в них достоверно выше [22].

В целом альфа-спирали типа ВНВ в большей степени стабилизированы специфическими аминокислотными остатками, а альфа-спирали ННВ – специфическими пентапептидами, т. е. чередованиями гидрофильных и гидрофобных остатков [22].

Наиболее устойчивыми типами вторичной структуры следует признать ВСВ, НВН, ВНВ и ННВ [22]. Универсальность выявленных различий заставила применить полученные данные на практике для создания вероятностного алгоритма PentaFOLD 3.0, тестирующего элементы вторичной структуры белков на предмет их стабильности.

### **Оригинальный алгоритм PentaFOLD 3.0 для осуществления поиска наиболее структурно устойчивых фрагментов белков**

По результатам анализа общих закономерностей формирования вторичной структуры белков нами был создан алгоритм PentaFOLD [47]. Его принцип работы можно описать следующим образом [34]. На первом этапе алгоритм находит комбинации аминокислотных остатков, которые в наибольшей степени похожи на петли ВСВ согласно расчётам по дипептидной шкале, в которой ВСВ сравнивается с ВВВ. Для такого расчёта учитываются все комбинации дипептидов в данном пентапептиде, в центре которого располагается остаток, для которого проводится предсказание. На втором этапе алгоритм проводит предсказание по альфа-спиральному и по бета-структурному паттерну.

Предсказание по альфа-спиральному паттерну включает: поиск бета-тяжей по дипептидной шкале (НВН против ННН), поиск альфа-спиралей по дипептидным шкалам (сначала ВНВ против ВВВ, затем ННВ против НВВ), поиск альфа-спиралей по аминокислотной и пентапептидной шкалам.

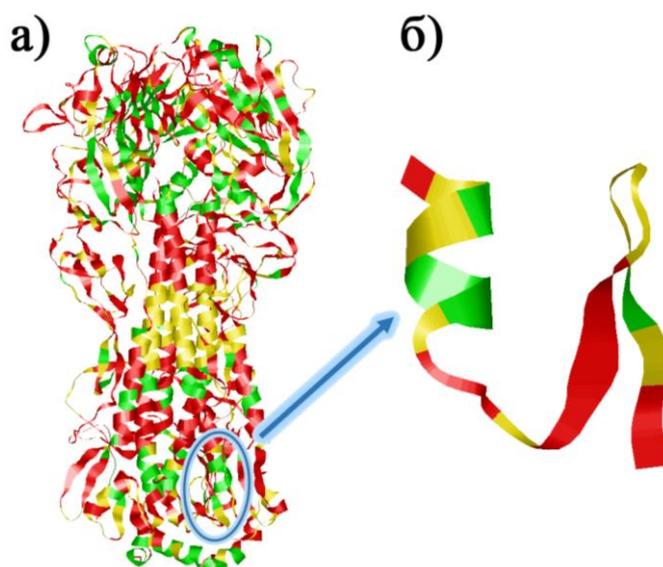
Предсказание по бета-структурному паттерну отличается тем, что на втором этапе предсказываются только самые стабильные альфа-спирали (по дипептидным шкалам: ВНВ против ВВВ и ННВ против НВВ). На третьем и четвёртом этапах находятся все фрагменты, способные к образованию бета-тяжа по дипептидной, пентапептидной или аминокислотной шкале.

Кроме того, PentaFOLD 3.0 [34] определяет тип петли, классифицируя её на ВСВ, НСН, ВСН и НСВ. Предсказание типа петли осуществляется по аминокислотной и по пентапептидной вероятностным шкалам.

Практическое применение данного алгоритма заключается в том, что с его помощью можно обнаружить те фрагменты белка, вторичная структура которых будет воспроизводиться сама по себе – без влияния соседних фрагментов полипептидной цепи. Именно такие фрагменты и следует использовать в качестве вакцинных пептидов. Разработанный метод может претендовать на универсальность, так как для его создания были использованы сведения о формировании вторичной структуры белками с разным аминокислотным составом [22].

**Отбор фрагментов белков с наиболее стабильной вторичной структурой согласно алгоритму PentaFOLD 3.0 для создания вакцинных пептидов**

На рисунке 1а представлены результаты поиска фрагментов гемагглютинаина эпидемического вируса гриппа H1N1 с наиболее стабильной вторичной структурой. Видно, что структура «короны» гемагглютинаина поддерживается в основном за счёт стабильных бета-тяжей из ядра этой части белка. На поверхности преимущественно расположены нестабильные фрагменты. «Ствол» гемагглютинаина представлен длинными альфа-спиралями, которые поддерживают свою структуру в основном за счёт взаимодействий друг с другом, так как включают в себя лишь отдельные стабилизированные «витки».



*a* – трёхмерная структура тримера гемагглютинаина эпидемического вируса гриппа H1N1 (идентификатор в PDB: 3LZG); *б* — модель пептида NY25, полученная с помощью SWISS MODEL; зелёным отмечены стабильные фрагменты, жёлтым – метастабильные, красным – нестабильные

**Рисунок 1. – Результаты работы алгоритма PentaFOLD 3.0 над трёхмерной структурой гемагглютинаина вируса гриппа H1N1**

На основании проведённого с помощью алгоритма PentaFOLD 3.0 анализа в качестве фрагмента для синтеза вакцинного пептида был выбран фрагмент 117–141 второго полипептида гемагглютинаина эпидемического вируса гриппа H1N1, включающий С-конец альфа-спирали и бета-шпильку. Соответствующий

ему синтетический пептид NY25 (рисунок 1б) имеет аминокислотную последовательность NLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFEFY, его рассчитанная молекулярная масса (2965,31 Да) полностью соответствует результатам масс-спектрометрии [23]. Степень очистки пептида составила 95,10% согласно данным высокоэффективной жидкостной хроматографии, что достаточно как для физико-химических, так и для иммунологических исследований.

Термический анализ раствора пептида NY25 (1,2 мг/мл) в 0,01М фосфатном буфере с pH=7,4 под контролем КД-спектрометра Chirascan дал исчерпывающие представления о его вторичной структуре. От 5°C до 45°C положение минимума на спектре КД постепенно смещается от 196 нм до 202 нм, а интенсивность его снижается. После достижения 50°C дальнейшее повышение температуры практически не влияет на форму спектра КД. Минимум при 196 нм соответствует состоянию пептида с более короткой бета-шпилькой, а минимум при 202 нм – состоянию с более длинной бета-шпилькой [34].

При высокой температуре пептид находится только в одном структурном состоянии (с более длинной бета-шпилькой), а при комнатной температуре и при температуре 37°C он должен существовать в двух формах.

Деконволюция спектров КД с помощью сервера CAPITO [Wiedemann C. et al., 2013] показала, что во всём интервале температур процент остатков в бета-структуре находится в пределах от 30% до 46%, а процент остатков в альфа-спирали – в пределах от 7% до 16%: по результатам поиска трёх наиболее схожих спектров в базе данных PCDDb (Protein Circular Dichroism Data Bank) [Whitmore L. et al., 2011]. В случае с пептидом NY25, состоящим из 25 остатков, речь идёт о коротком альфа-спиральном фрагменте (4 остатка) и бета-шпильке длиной от 8 до 12 аминокислотных остатков, что в целом соответствует модели пептида NY25, полученной по шаблону полноразмерного гемагглютинаина с помощью SWISS MODEL [Biasini M. et al., 2014] (рисунок 1б).

Проведенный эксперимент по термическому тушению флюоресценции остатков тирозина в пептиде NY25 показал, что диссоциация его олигомеров начинается при температуре 40°C. В пределах от 40°C до 50°C пептид существует в двух формах (олигомеры более высокого и более низкого порядков) [34]. Можно заключить, что температура начала диссоциации олигомеров не совпадает с температурой начала удлинения бета-структуры, а температура полной диссоциации соответствует концу перехода к форме с более длинной бета-структурой.

Пептид NY25 был использован в качестве антигена для иммунизации кроликов: первое введение (1 мг) совместно с полным адьювантом Фрейнда, три последующих (0,25 мг) совместно с неполным адьювантом Фрейнда, подкожно. Затем внутривенно (2 мг), совместно с неполным адьювантом Фрейнда и полиоксидонием (0,3 мг на кролика), дважды. Забор крови перед

началом иммунизации (за 1 сутки до введения антигена) был обязательным пунктом, так как именно по отношению к ней оценивалась интенсивность иммунного ответа. Количественную оценку иммунного ответа проводили путём аффинной хроматографии. На колонке AminoLink Plus (Thermo Scientific) с иммобилизованным пептидом NY25 выделяли антитела, способные связываться с этим пептидом. После 11 промывок колонки 0,1М фосфатным буфером с pH=7,4 переходили к элюции с помощью 0,2М глицин·HCl буфера с pH=2,75 (буфер для элюции антител, Thermo Scientific).

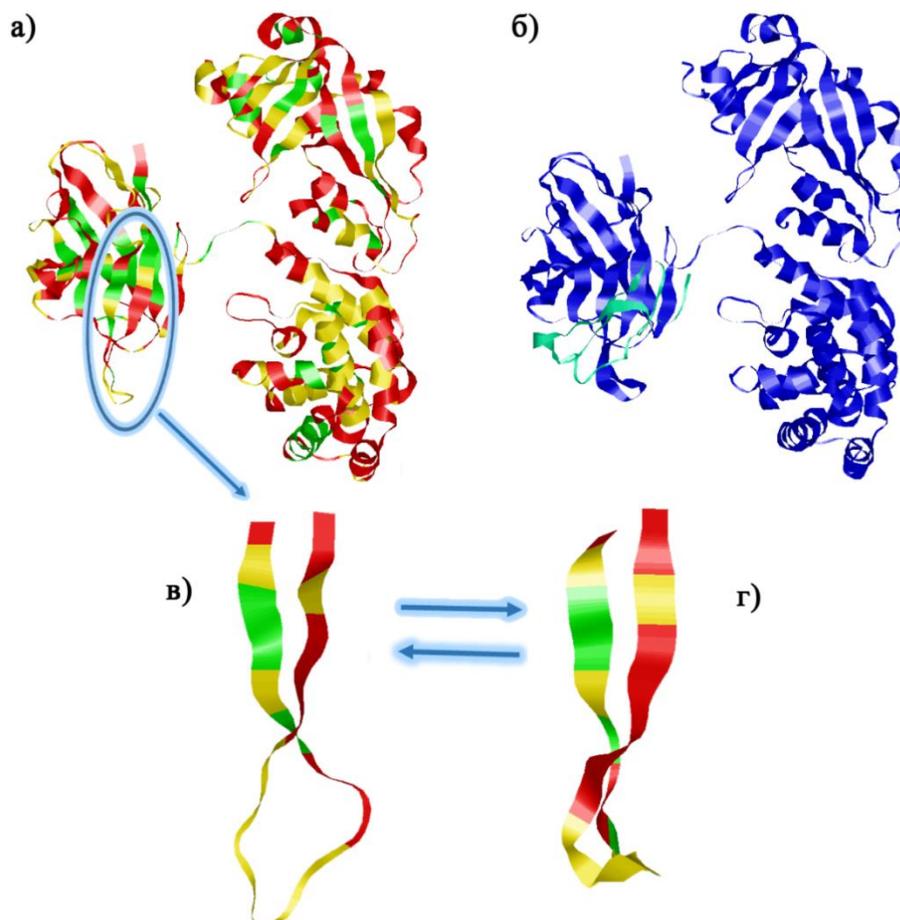
У животного № 1 внутрикожная дополнительная иммунизация вызвала «сдвиг» профиля элюции в сторону четвёртого и пятого элюатов. Такой сдвиг может свидетельствовать о значительном повышении аффинности антител в клонах В-лимфоцитов, ранее вовлечённых в иммунный ответ. Животное № 2 отреагировало на внутрикожное введение NY25 резким ростом количества иммуноглобулинов во втором (в 2,17 раз), третьем (в 2,98 раз) и четвёртом элюатах (в 2,84 раза).

Очищенные антитела животного № 2 к пептиду NY25 сконцентрировали с помощью колонки для фильтрации и нанесли полученный раствор (100 мкл) в 0,1М фосфатном буфере pH=7,4 на колонку MicroLink Plus (Thermo Scientific) с иммобилизованным рекомбинантным гемагглютинином. После инкубации в течение 2 часов только 12% антител к пептиду NY25 не связались с гемагглютинином. В сумме в результате последовательной промывки колонки 0,1М фосфатным буфером pH=7,4, 1М раствором NaCl, кислотным буфером для элюции удалось разрушить только 54% образовавшихся на колонке комплексов «антиген/антитело», а оставшиеся 46% комплексов были разрушены в результате промывки буфером для элюции при нагревании и при обработке ультразвуком, что свидетельствует о высокой аффинности антител к NY25 к полноразмерному гемагглютину [34].

Описанные выше свойства пептида NY25 делают его перспективным кандидатом для разработки синтетической (пептидной) вакцины против вируса гриппа H1N1, основой действия которой будет выработка антител, препятствующих проникновению генетического материала вируса в цитоплазму клетки на этапе слияния мембран [23].

На рисунке 2а приведены результаты работы оригинального алгоритма PentaFOLD 3.0 над трёхмерной структурой дифтерийного токсина. Заметно, что его бета-структурный домен отличается высокой степенью устойчивости: среди десяти бета-тяжей, формирующих его каркас, у восьми есть структурно-устойчивые фрагменты, два других обладают метастабильными участками. Как видно на рисунке 2б, рецептор для дифтерийного токсина – гепарин-связывающий фактор, подобный эпидермальному фактору роста, связывается не со всей поверхностью бета-структурного домена, а только с четырьмя бета-

тяжами и с характерной петлёй между двумя из них [Louie G. V. et al., 1997]. По этой причине в качестве фрагмента для создания вакцинного пептида был выбран именно этот участок в форме бета-шпильки [4].



*a* — трёхмерная структура дифтерийного токсина (идентификатор в PDB: 1TOX);  
*b* — структура комплекса (идентификатор в PDB: 1XDT) дифтерийного токсина (обозначен синим) с фрагментом рецептора (обозначен зелёным); *в* — модель пептида SF23 согласно PeFOLD 3.5; *г* — модель пептида SF23 согласно SWISS MODEL; зелёным отмечены стабильные фрагменты, жёлтым – метастабильные, красным – нестабильные

**Рисунок 2. – Результаты работы алгоритма PentaFOLD 3.0 над трёхмерной структурой дифтерийного токсина**

Согласно результатам работы оригинального алгоритма для сравнения неструктурированных петель с петлями, в которых образуются спирали 3/10, на верхушке петли рассматриваемого фрагмента дифтерийного токсина действительно должна образовываться соответствующая спираль 3/10 [10]. Собственно, перспективность использования предложенного вакцинного пептида SF23 основывается на высокой вероятности того, что в нём воспроизведётся структура соответствующей петли дифтерийного токсина со спиралью 3/10. Последняя отсутствует на наиболее вероятной модели пептида от PeFOLD 3.5 [Shen Y. et al., 2014] (рисунок 2в), но присутствует на модели пептида, полученной с помощью SWISS MODEL [Biasini M. et al., 2014] по шаблону 1TOX (рисунок 2г).

Пептид с аминокислотной последовательностью SIGVLGYQKTVDHNTKVNNSKLSLF (SF23) имеет молярную массу 2535 Да, что соответствует теоретически рассчитанной согласно результатам масс-спектрометрии [11]. Степень очистки пептида SF23 составила 95,44%.

Проведенный термический анализ раствора пептида SF23 (0,94 мг/мл) в 0,01M фосфатном буфере с pH=7,4 под контролем КД-спектрометра свидетельствует о структурных изменениях в нём по мере нагревания.

На спектрах при температуре от 5°C до 25°C ярко выражен минимум при 202 нм, свидетельствующий об относительно низком содержании вторичной структуры в пептиде. Однако на спектрах присутствует и характерный «балкон» с минимумом при 222 нм, свидетельствующий о наличии в пептиде бета-структуры. Результаты деконволюции спектров с помощью сервера CAPITO [Wiedemann S. et al., 2013] показали, что процент остатков, образующих бета-структуру в пептиде SF23, составляет от 30% до 35% (т. е. 8 остатков). Процент остатков в альфа-спиралях равен от 10% до 14%, что при короткой длине пептида составляет максимум 3 аминокислотных остатка. Таким образом, при низкой температуре в пептиде SF23 должна воспроизводиться бета-структура у основания, а петля должна быть неструктурированной, что соответствует модели с рисунка 2в.

При температуре от 30°C до 45°C характер спектров КД претерпевает следующие изменения: минимум при 202 нм становится менее выраженным, а «балкон» становится более плоским и глубоким. Такая форма «балкона» приближает его к спектрам, характерным для белков, содержащих и бета-тяжи, и альфа-спирали. Действительно, деконволюция соответствующих спектров свидетельствует о некотором приросте альфа-спирального компонента (от 10% до 25%) при сохранении бета-структуры (30%–34%).

Дальнейшее нагревание (от 50°C до 80°C) не приводит к углублению «балкона», но минимум при 202 нм продолжает сокращаться. Деконволюция спектров при высоких температурах свидетельствует о сохранении такого же процента остатков в альфа-спирали, как и при более низкой температуре (9%–25%), и о тенденции к удлинению бета-тяжей (30%–41%).

Судя по результатам анализа спектров КД, при высоких температурах структура пептида SF23 в наибольшей степени соответствует модели, изображённой на рисунке 2г. При температурах, близких к физиологической, имеет место сосуществование, как минимум, двух форм пептида: со спиралью 3/10 на вершине петли и без неё [34].

Важно отметить, что судя по результатам изучения спектров флюоресценции пептида SF23 при температуре от 39°C до 42°C он претерпевает структурный переход, приводящий к увеличению квантового выхода флюоресценции единственного остатка тирозина [37], что свидетельствует о диссоциации его олигомеров.

Пептид SF23 был использован нами как антиген для иммунизации кроликов. Первое введение антигена (2 мг) проводили внутрикожно вместе с полным адьювантом Фрейнда (1:1), совместно с внутримышечным ведением полиоксидония (0,3 мг на кролика). Дополнительную иммунизацию осуществляли с неполным адьювантом Фрейнда (1:1), внутрикожно (0,5 мг), в 8 местах введения, совместно с введением полиоксидония.

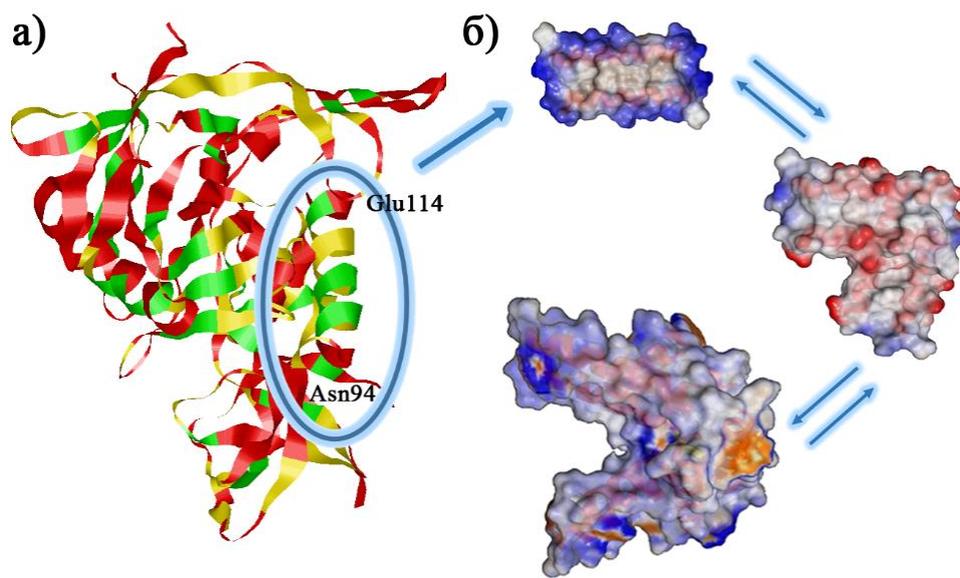
У животного №1 после иммунизации повысилось количество иммуноглобулинов: в большей степени во втором элюате (интенсивность флюоресценции возросла на 45% по сравнению с исходным уровнем – в неиммунной сыворотке). У животного №2 после такого же курса иммунизации интенсивность флюоресценции во втором элюате возросла в 2,7 раз, что свидетельствует о различиях в иммунной реактивности между разными животными.

Для проверки способности антител животного №2, выработанных к пептиду SF23, к связыванию с полноразмерным дифтерийным токсином, последний был иммобилизован на колонке для аффинной хроматографии MicroLink Plus. В результате последовательной промывки колонки 0,1М фосфатным буфером pH=7,4, 1М раствором NaCl, кислотным буфером для элюции удалось разрушить 42% образовавшихся на колонке комплексов «антиген/антитело», а оставшиеся 58% комплексов были разрушены в результате промывки тем же буфером для элюции при нагревании и при обработке ультразвуком, что подтверждает высокую степень аффинности антител к SF23 к полноразмерному дифтерийному токсину [34].

Результаты иммунизации обоих животных подтвердили факт иммуногенности пептида SF23 при внутрикожном введении. Интересно отметить, что в антидифтерийной лошадиной сыворотке присутствуют антитела, способные связываться с пептидом SF23, что должно вносить свой вклад в её протективные свойства [11]. Важно отметить, что фрагмент дифтерийного токсина, соответствующий пептиду SF23, отличается низким уровнем мутабельности [11]. Все эти данные в совокупности позволяют предложить пептид SF23 в качестве альтернативы дифтерийному анатоксину. Преимуществами пептида являются: повышение аффинности антител, выработка антител, обладающих нейтрализующей способностью, снижение риска развития аутоиммунных реакций.

По результатам работы оригинального алгоритма PentaFOLD 3.0, среди устойчивых элементов вторичной структуры поверхностного белка gp120 вируса иммунодефицита человека 1 типа выделяются три бета-тяжа в ядре молекулы и первая альфа-спираль (рисунок 3а). Если бета-тяжи постоянно находятся в ядре белка, то про первую альфа-спираль, границы которой подписаны на рисунке 3а, известно, что она становится доступной для

связывания с антителами в тот момент, когда gp120 образует комплекс с CD4 [Tolbert W. D. et al., 2019]. В состав эпитопа для одного из антител (A32), способных к подавлению размножения ВИЧ1 за счёт антитело-зависимой клеточной цитотоксичности входят остатки Gln103, Glu106, Asp107, Ser110, Asp113, Gln114, формирующие гидрофильную поверхность первой альфа-спирали [Tolbert W. D. et al., 2016]. По этой причине перспективной стратегией в профилактике и лечении ВИЧ1 может быть иммунизация пептидом, структура которого повторяет таковую для первой альфа-спирали gp120.



*a* – трёхмерная структура поверхностного белка gp120 ВИЧ1 (идентификатор в PDB: 5F4L, обозначены границы первой альфа-спирали); *б* – модели олигомеров пептида NQ21, полученные с помощью алгоритма Hex 8.0.0: на димере синим обозначена гидрофильная поверхность; на тетрамере синим обозначены положительно заряженные остатки, красным – отрицательно заряженные; на октамере оранжевым обозначены ароматические остатки, жёлтым – взаимодействующие остатки триптофана

**Рисунок 3. – Результаты работы алгоритма PentaFOLD 3.0 над трёхмерной структурой поверхностного белка gp120 ВИЧ1**

Фрагмент gp120 ВИЧ1, соответствующий его первой альфа-спирали, имеет следующую консенсусную последовательность: NMWKNNMVEQMHEDIISLWDQ. Именно такая последовательность аминокислотных остатков была использована нами для синтеза пептида под названием NQ21. Молярная масса этого пептида равна 2662,05 Да. Степень очистки пептида NQ21 составила 98,4%.

Деконволюция спектров КД с помощью сервера CAPITO [Wiedemann S. et al., 2013] показала, что пептид NQ21 должен быть неструктурированным (от 48% до 58% аминокислотных остатков не должно образовывать ни альфа-спираль, ни бета-тяжи) во всём диапазоне температур.

Известно, что остатки триптофана способны существенным образом влиять на спектр КД в дальнем ультрафиолете в том случае, если они сближены друг с другом [Woody R. W., 1994]. В пептиде NQ21 есть два остатка триптофана: на

N-конце (Trp3) и на C-конце (Trp19). Если предположить, что структура NQ21 представляет собой длинную альфа-спираль, то взаимодействовать молекулы пептида должны в положении «голова к хвосту» на всём протяжении альфа-спиралей, согласно алгоритму Hex 8.0.0 [Ghoorah A. W. et al., 2013] (рисунок 36). Такое расположение молекул пептида обусловлено тем, что на N-конце его локализован положительный заряд, а в средней части и на C-конце находятся отрицательно заряженные боковые цепи аминокислотных остатков. Кроме того, молекулы должны контактировать друг с другом своими гидрофобными поверхностями. В димере пептида NQ21 остатки триптофана далеки друг от друга, так же, как и в тетрамере (рисунок 36) [21]. Однако в наиболее вероятном октамере пептида возникают ароматические взаимодействия между остатками триптофана из разных молекул [21] (рисунок 36). Если пептид NQ21 образует октамеры, то в них могут возникать взаимодействия между остатками триптофана, приводящие к искажению спектра КД.

Средний разностный спектр для результатов КД при низких температурах (от 5°C до 50°C с шагом в 30°C) имеет форму, характерную для альфа-спиральных белков с двумя минимумами: при 209 нм и 222 нм [21]. Получается, что по мере нагревания октамеры пептида NQ21 диссоциируют, и сигнал от вторичной структуры становится более заметным на фоне слабеющего сигнала от взаимодействующих остатков триптофана с минимумом при 196 нм и максимумом при 217 нм. Спектр триптофана заметен при вычислении обратного среднего разностного спектра при высоких температурах (от 55°C до 80°C с шагом в 30°C) [21].

Судя по результатам сравнения спектров флюоресценции пептида NQ21 при разных температурах процесс диссоциации его олигомеров в температурном диапазоне от 26°C до 54°C не имеет точки начала и конца, что свидетельствует о том, что во всём этом диапазоне пептид существует как смесь олигомеров [21].

Наличие у пептида NQ21 в 0,01М фосфатном буфере с pH=7,4 спектра КД в ближнем ультрафиолете говорит о том, что остатки триптофана вовлечены во взаимодействия с боковыми цепями других аминокислот [21].

Согласно анализу спектров ИК НПВО пептида NQ21 в 0,01М фосфатном буфере при pH=7,4 по мере высыхания образца, зарегистрированных на ИК Фурье спектрометре iS50 Nicolet (Thermo Scientific) со встроенной приставкой НПВО с алмазным кристаллом, в растворе пептид NQ21 находится в альфа-спиральном состоянии, при взаимодействии с гидрофобной поверхностью образует бета-структуру, а при контакте с альфа-спиральными молекулами из раствора адсорбированные молекулы бета-структуру утрачивают [45].

Рамановские спектры были сняты нами для трёх карт 15×15 точек на кремниевой подложке, покрытой коллоидным серебром [Bandarenka H. V. et al., 2016] с помощью сканирующего Рамановского спектрометра Confotec NR500

с использованием лазера с длиной волны 633 нм. Известно, что для альфа-спиральных белков полоса амид I на Рамановских спектрах находится в районе от  $1640\text{ см}^{-1}$  до  $1658\text{ см}^{-1}$ , для бета-структурных – в районе от  $1665\text{ см}^{-1}$  до  $1680\text{ см}^{-1}$  [Ryguła A. et al., 2013]. Для пептида NQ21 положение пика амид I приходится на  $1645\text{ см}^{-1}$ , что характерно для альфа-спирального состояния [21]. Обнаруживается этот пик в районе от  $1643\text{ см}^{-1}$  до  $1647\text{ см}^{-1}$  у 60% спектров (всего зарегистрировано 735 спектров) [52]. Известно, что пик амид I во время спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния регистрируется не всегда, а только при максимальном приближении пептидных связей к гидрофильной поверхности подложки [Kurouški D. et al., 2013].

Результаты спектральных методов исследования показали, что пептид NQ21 существует в водном растворе в альфа-спиральной форме и образует олигомеры, что позволило продолжить исследование его иммуногенных свойств.

Первое введение антигена (0,5 мг) проводили внутрикожно вместе с полным адьювантом Фрейнда (1:1) совместно с полиоксидонием (0,3 мг на кролика). Дополнительную иммунизацию (0,25 мг) осуществляли дважды внутрикожно с неполным адьювантом Фрейнда (1:1) совместно с полиоксидонием.

По результатам аффинной хроматографии, после иммунизации у животного № 1 повысилось количество иммуноглобулинов в первом–третьем элюатах (в 1,8–2 раза по сравнению с исходным уровнем в неиммунной сыворотке). У животного № 2 после такого же курса иммунизации интенсивность флюоресценции (а значит и количество иммуноглобулинов) в первом элюате возросла на 50%, а в третьем–пятом элюатах увеличилась в 2–3 раза, что свидетельствует о выработке высокоаффинных антител.

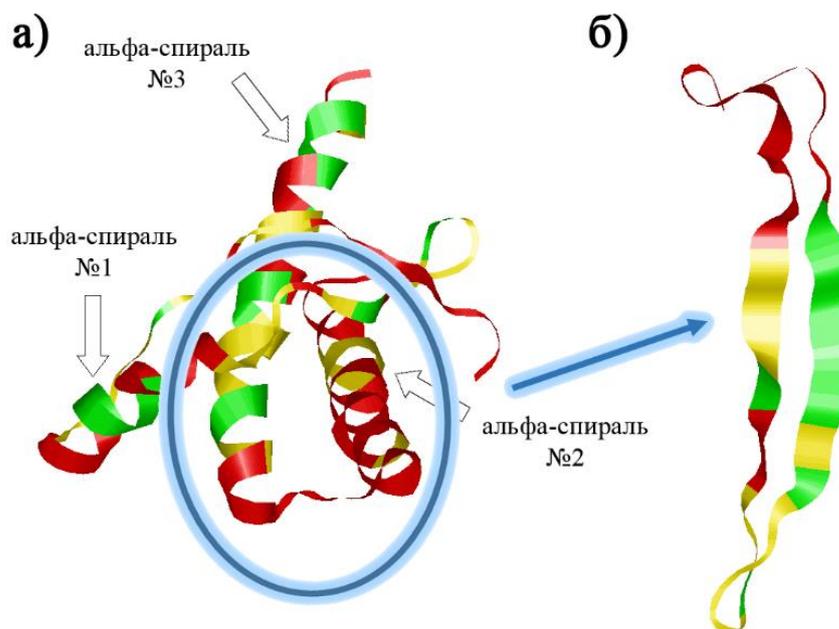
Для проверки способности антител к NQ21 к связыванию с полноразмерным белком на колонке MicroLink Plus нами были иммобилизованы сконцентрированные антитела к данному пептиду от животного № 2. Сконцентрированный раствор рекомбинантного белка gp160 ВИЧ1 из набора для ИФА-диагностики ВИЧ-инфекции (Фармлэнд) был нанесён на колонку с иммобилизованными антителами. В результате последовательной промывки колонки 0,1М фосфатным буфером pH=7,4, 1М раствором NaCl, кислотным буфером для элюции удалось разрушить всего 32% образовавшихся на колонке комплексов «антиген/антитело», а более двух третей (68%) комплексов были разрушены в результате промывки тем же буфером для элюции при нагревании и при обработке ультразвуком, что подтверждает способность антител к пептиду NQ21 образовывать высокоаффинные комплексы с полноразмерным белком [34].

Несмотря на различия в реакции кроликов на введение пептида NQ21, оба животных были успешно проиммунизированы синтетическим пептидом. В результате проделанной работы установлен факт того, что пептид NQ21

способен вызывать В-клеточный иммунный ответ при внутрикожном введении. Полученные результаты подтверждают факт воспроизведения пептидом NQ21 структуры первой альфа-спирали белка gp120 ВИЧ1 с помощью трёх спектральных методов исследования [21, 45, 52] и дают основания для дальнейшей разработки пептидной профилактической и лечебной вакцины против ВИЧ на его основе.

### **Поиск фрагмента прионного белка человека, способного к альфа-бета переходу: вторичная структура и иммуногенные свойства прионного пептида СС36**

На рисунке 4а приведены результаты работы алгоритма PentaFOLD 3.0 над трёхмерной структурой прионного белка человека (PDB ID: 1HJM). Среди трёх альфа-спиралей структурированного домена выделяется альфа-спираль № 2, так как в ней отсутствуют стабильные фрагменты, и только два из шести витков включают метастабильные остатки [15].



*a* – трёхмерная структура структурированного домена прионного белка человека (идентификатор в PDB: 1HJM); *б* – модель пептида СС36, полученная с помощью алгоритма PepFOLD 3.5, с содержанием остатков в элементах вторичной структуры, соответствующим результатам анализа спектров кругового дихроизма; зелёным отмечены стабильные фрагменты, жёлтым – метастабильные, красным – нестабильные

**Рисунок 4. – Результаты работы алгоритма PentaFOLD 3.0 над трёхмерной структурой структурированного домена прионного белка человека**

По сравнению со второй альфа-спиралью, альфа-спираль № 1 выглядит гораздо более устойчивой: в ней стабильными являются два центральных витка при общей длине в четыре витка. Третья альфа-спираль (7 витков) включает три стабилизированных и три метастабильных фрагмента при наличии нестабильного N-концевого витка [15]. Действительно, первая альфа-спираль прионного белка считается наиболее стабильной по результатам молекулярно-динамических исследований [Santini S., Derreumaux F., 2004].

Важно отметить, что петля между второй и третьей альфа-спиралями тоже является нестабильной, в отличие от петель вокруг альфа-спирали № 1 (рисунок 4а). Логично предположить, что наиболее склонным к переходу в бета-структуру фрагментом рассматриваемого домена прионного белка будет вторая альфа-спираль. Вторая альфа-спираль образует большое количество контактов с третьей альфа-спиралью, и в том числе – дисульфидную связь. В таком случае третья альфа-спираль должна поддерживать альфа-спиральную конформацию второй за счёт множественных контактов. При переходе второй альфа-спирали в бета-структуру должна складываться обратная ситуация. Наиболее стабильным является С-конец третьей альфа-спирали (рисунок 4а), стабилизирован и последний виток, непосредственно взаимодействующий со второй альфа-спиралью [15].

Для проверки гипотезы о том, что без стабилизированных фрагментов третьей альфа-спирали её N-концевая часть подвергнется переходу в бета-структуру, был сконструирован следующий пептид: 179-CPNITIKQHTVTTTTKGENWTETDVKMRERVREQMC-214. Первый и последний остатки в этом пептиде соединены друг с другом дисульфидной связью [15]. Вместо остатка фенилаланина в последовательность введён остаток триптофана как флюоресцентная метка, реагирующая на характер собственного микроокружения [15]. С целью снижения амилоидогенных свойств вместо Met28 и Val32 в последовательность пептида были включены остатки аргинина, а вместо остатка Val2 был введён пролин [15].

На спектре кругового дихроизма пептида СС36 (в 0,01М фосфатном буфере, при концентрации 246 мкг/мл, рН=5,3) заметен минимум при 200 нм, возникающий за счёт вклада неструктурированных фрагментов цепи, и «балкон» в районе от 210 нм до 230 нм с изломом при 222 нм, свидетельствующий о наличии вторичной структуры. Анализ спектров с помощью сервера CAPITO [Wiedemann S. et al., 2013] заставляет признать наличие как бета-структуры (18%–35%), так и короткого альфа-спирального фрагмента (10%–13%) в пептиде СС36. Другими словами, альфа-спиральный фрагмент должен иметь длину в четыре остатка, а бета-структура должна быть длиной в 8–14 остатков. При нагревании такая структура остаётся стабильной. Важно подчеркнуть, что спектры кругового дихроизма пептида СС36 без дисульфидной связи аналогичны таковым для того же пептида с дисульфидной связью [15].

Модель трёхмерного строения пептида СС36 на основании данных спектроскопии кругового дихроизма была создана с помощью сервера PepFOLD 3.5 [Shen Y. et al., 2014]. Среди ста моделей пептида была выбрана та, которая соответствует результатам КД [15]. Эта модель (рисунок 4б) была обработана алгоритмом PentaFOLD 3.0: вторая альфа-спираль превращается в стабильный бета-тяж, а третья альфа-спираль – метастабильная – превращается в метастабильный бета-тяж (рисунок 4б).

О формировании разнообразных контактов остатком триптофана с другими аминокислотными остатками свидетельствует появление пика на спектре кругового дихроизма пептида СС36 при рН=5,3 в ближнем ультрафиолете (от 260 нм до 290 нм) [46]. Результаты анализа спектров флюоресценции пептида СС36 с дисульфидной связью позволяют говорить о диссоциации его олигомеров при температуре от 31°C до 37°C, для того же пептида без дисульфидной связи – при температуре от 28°C до 32°C.

С целью повышения растворимости пептида СС36 при рН=7,4 его конъюгировали с носителем – бычьим сывороточным альбумином (БСА). Для конъюгации использовался SMCC (сукцинимидил-4-N-малеимидометилциклогексан-1-карбоксилат), процесс проводился по стандартному протоколу, БСА и СС36 были взяты в соотношении 1:1 по массе, что соответствует 15–16 молекулам СС36 на одну молекулу БСА.

Спектр кругового дихроизма для конъюгата БСА с пептидом СС36 имеет форму, соответствующую преимущественно бета-структурным белкам, в то время как сам БСА – белок альфа-спиральный. При деконволюции спектров конъюгата СС36 с БСА с помощью программы CAPITO [Wiedemann S. et al., 2013] процент остатков в бета-структуре составил 30%–46%, процент остатков в альфа-спиралях – 7%–16%.

При анализе спектров флюоресценции конъюгата СС36 с БСА по мере увеличения температуры замечен структурный переход, аналогичный таковому для чистого СС36, в интервале от 28°C до 31°C. Эти данные заставляют признать, что конъюгация с БСА не мешает молекулам пептида СС36 образовывать олигомеры [34].

На спектрах триптофановой флюоресценции БСА доминирует коротковолновой компонент (330 нм). На спектрах же конъюгата пептида СС36 с БСА доминирует длинноволновой компонент (360 нм), но отношение его к коротковолновому (330 нм) заметно ниже, чем на спектрах для молекул чистого пептида СС36, что говорит о вкладе двух остатков триптофана самого БСА в интегральный спектр [35].

Иммунизацию кроликов конъюгатом пептида СС36 с БСА (первично – по 1 мг с полным адьювантом Фрейнда, дополнительно – по 0,25 мг трижды с неполным адьювантом Фрейнда) проводили по стандартному протоколу. Иммунизировали исключительно подкожно.

Для оценки эффективности иммунизации сравнивали значения интенсивности флюоресценции остатков триптофана в элюатах после аффинной очистки иммунных сывороток обоих животных на колонке с иммобилизованным пептидом СС36 по сравнению с их же сыворотками, полученными за один день до начала иммунизации. У животного № 1 наибольший прирост количества антител отмечен в первом и втором элюатах (в 2,5–2,9 раз) на 14-й день после

завершения иммунизации. На 42-й день замечен сдвиг максимума элюции к третьему и четвертому элюатам, что свидетельствует о повышении аффинности антител к антигену [34]. У животного № 2 на 14-й день после последнего введения антигена прирост количества антител был максимальным в первом–третьем элюатах (в 2–4,5 раза), а на 42-й день – во втором–пятом элюатах (в 5,3–8,3 раза) [34]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что структура пептида СС36 в конъюгированном с БСА состоянии не изменилась настолько, чтобы антитела, выработанные к нему, не смогли распознать пептид СС36, иммобилизованный через остатки Lys и N-концевую  $-NH_2$  группу на агарозном геле, содержащем альдегидные группы.

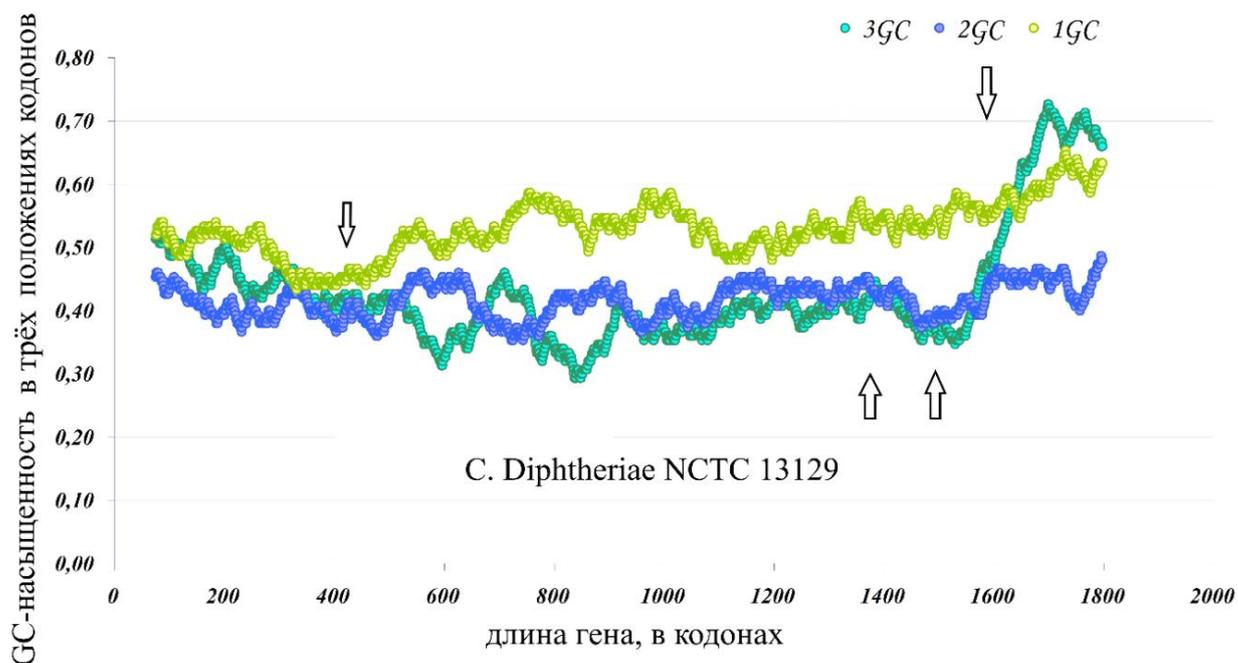
Кроличьи поликлональные антитела к рекомбинантному прионному белку человека (Cloud-Clone Corp.) были иммобилизованы на колонке MicroLink Plus. Насыщенный раствор конъюгата пептида СС36 в 0,1М фосфатном буфере с 0,15М NaCl pH=7,2 инкубировали на колонке с антителами к прионному белку человека в течение двух часов. Большинство (80%) исходно удержанных молекул конъюгата было удалено с колонки в результате последовательной промывки колонки 0,1М фосфатным буфером pH=7,4, 1М раствором NaCl, кислотным буфером для элюции. Однако 20% комплексов «антиген/антитело» были разрушены только в результате элюции при 60°C, в том числе под действием ультразвука [34]. Полученные результаты говорят о том, что часть кроличьих поликлональных антител к рекомбинантному прионному белку человека, перешедшему в бета-структурную форму, распознают бета-структурный пептид СС36, а значит разработка вакцины против прионных болезней с использованием конъюгата пептида СС36 с белком-носителем в качестве антигена является целесообразной.

На примере прионного белка видно, что далеко не каждый пептид будет иметь такую же конформацию, как соответствующий ему фрагмент полипептидной цепи. С помощью алгоритма PentaFOLD 3.0 можно выявить как структурно устойчивые фрагменты белка, так и области, вторичная структура которых не может воспроизвестись сама по себе, т. е. без участия дальних взаимодействий с аминокислотными остатками из других фрагментов того же белка.

### **Мутационное давление, возникающее во время транскрипции и трансляции в генах и их фрагментах: его роль в разработке ДНК-вакцин и препаратов генной терапии**

Резкие изменения в GC-насыщенности третьих положений кодонов на протяжении одного и того же бактериального гена могут возникать в результате наличия в его кодирующем участке автономно транскрибирующихся фрагментов. Как видно на рисунке 5, на протяжении гена *SpaC Corynebacterium diphtheriae* GC-насыщенность третьих положений кодонов изменяется следующим образом: в начале гена она находится на уровне  $45,51 \pm 0,36\%$ , затем

снижается до  $38,72 \pm 0,20\%$ , а в конце гена резко увеличивается до  $64,61 \pm 0,91\%$  [12]. Для объяснения таких резких изменений в уровне 3GC на протяжении одного и того же кодирующего участка были предсказаны промоторы транскрипции тремя методами (BPROM, NNP [Reese M. G., 2001], PromPredict [Rangannan V., Bansal M., 2009]). Всеми тремя методами одновременно были обнаружены только два промотора: в районе кодона № 400 и в районе кодона № 1600 (рисунок 5) [12]. Важно подчеркнуть, что именно возле этих участков изменяется уровень 3GC.



**Предсказанные промоторы отмечены стрелками вниз, предсказанные терминаторы транскрипции – стрелками вверх**

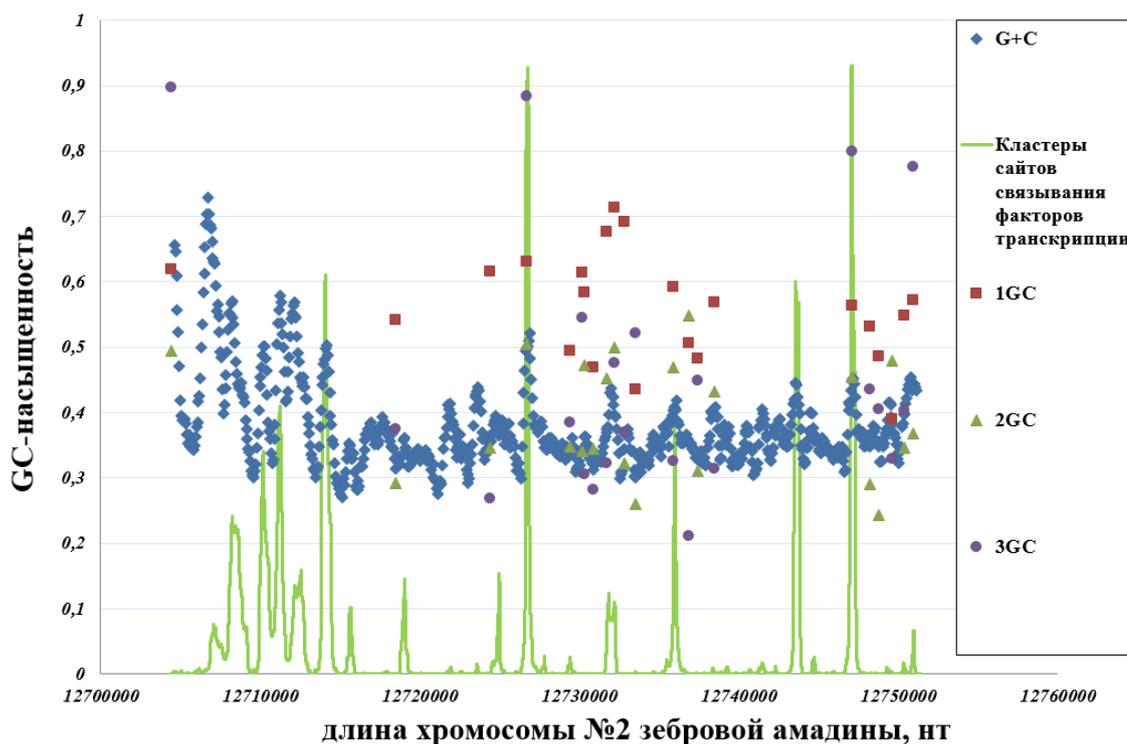
**Рисунок 5. – GC-насыщенность первых, вторых и третьих положений кодонов (1GC, 2GC, 3GC) на протяжении гена SpaC *Corynebacterium diphtheriae***

С помощью алгоритма RNAmotif [Macke T. et al., 2001] в одной из последовательностей SpaC *Corynebacterium diphtheriae* (штамм Va01) предсказываются два терминатора транскрипции – непосредственно перед вторым промотором.

Для того чтобы выяснить, отличаются ли три фрагмента гена SpaC *Corynebacterium diphtheriae* по направлению мутационного давления, нами был применен оригинальный алгоритм VVTAK VarInvar [12]. Было доказано, что мутационное давление на протяжении гена SpaC *Corynebacterium diphtheriae* меняется от симметричного АТ-давления к ассиметричному А<sub>2</sub>Т<sub>2</sub>Т<sub>4</sub> давлению, а затем – к ассиметричному G<sub>2</sub>G<sub>4</sub> давлению [12]. Первый промотор активируется в такие фазы жизненного цикла бактерии, когда работа системы репарации повреждений в ДНК приводит к повышению частоты возникновения транзиций GC на АТ и трансверсий G на Т. Второй промотор активируется в такие фазы

жизненного цикла бактерии, когда работа системы репарации приводит к увеличению частоты возникновения транзиций А на G и трансверсий Т на G [12].

Подобная ситуация была описана нами в гене фосфофруктокиназы птиц – зебровой амадины (рисунок 6) и мухоловки белошейки. В этих генах существуют аномально GC-богатые экзоны. В результате анализа нуклеотидной последовательности гена фосфофруктокиназы зебровой амадины с помощью алгоритма CISTER [Frith M. C. et al., 2001] нам удалось обнаружить скопление (кластеры) сайтов для связывания факторов транскрипции именно там, где находятся экзон № 4 и экзон № 17 (рисунок 6) [9].



**Приведены уровни GC-насыщенности в первых, вторых и третьих положениях кодонов (1GC, 2GC, 3GC) в экзонах, вероятность расположения кластера связывания факторов транскрипции (по алгоритму Cister)**

**Рисунок 6. – GC-насыщенность на протяжении гена фосфофруктокиназы зебровой амадины в скользящих окнах по 120 нуклеотидов**

С помощью алгоритма Promoter 2.0 [Knudsen S., 1999] удалось обнаружить наличие промоторов как в области экзона № 4, так и в области экзона № 17. С помощью алгоритма MirEval 2.0 [Gao D. et al., 2013] в этих областях нами обнаружены гены, кодирующие предшественников микроРНК: на «плюс» цепи в экзоне № 4 и на «минус» цепи в экзоне № 17 [9]. Аналогичная ситуация характерна и для экзонов № 4 и № 18 гомологичного гена мухоловки-белошейки [9].

Для генов человека база данных Ensembl предоставляет сведения не только о консенсусной последовательности экзонов и интронов, но и обо всех известных мутациях в них. Анализ этих данных важен для разработки

препаратов таргетной терапии. Как в гене, кодирующем белок APC, так и в гене, кодирующем рецептор эпидермального фактора роста, обнаружено мутационное АТ-давление: как при анализе герминативных мутаций, так и при анализе соматических мутаций в раковых клетках [17, 25, 53].

С использованием данных об интенсивности транскрипции [Shabman R. S. et al., 2014] мы протестировали гипотезу о влиянии этого фактора на нуклеотидный состав генов вирусов Эбола и Марбург [13]. Как выяснилось, от интенсивности транскрипции генов этих РНК-минус вирусов в прямой зависимости находится их насыщенность цитозином [13]. Эта зависимость проявляется как при сравнении разных генов, так и при сравнении фрагментов одного и того же гена. Так, четыре гена, демонстрирующие более высокий уровень экспрессии (NP, VP35, VP40, GP), отличаются повышенным уровнем цитозина, в отличие от генов, уровень экспрессии которых ниже в культурах клеток VERO и TNP-1 через 24 часа после заражения (VP30, VP24, Pol). При этом в геноме вируса Эбола в генах NP и GP присутствуют характерные пики частоты использования цитозина, соответствующие лишь некоторым фрагментам этих генов [13]. Этим пикам соответствуют фрагменты РНК, отличающиеся наибольшей интенсивностью «покрытия» в процессе глубокого секвенирования [Shabman R. S. et al., 2014] за счёт низкой способности к образованию шпилек РНК (вторичной структуры, характерной для одноцепочечной РНК) [13]. Коэффициент корреляции между средним «покрытием» и частотой использования цитозина во фрагментах РНК длиной 500 нуклеотидов составил 0,6886 в клеточной линии VERO и 0,6202 в клеточной линии TNP-1 [13]. В геноме вируса Марбург соответствующие коэффициенты корреляции составили 0,6138 и 0,7956 [13].

Исследование распределения частот использования нуклеотидов по единственной открытой рамке считывания РНК-плюс вируса Зика заставило признать возможность влияния на мутационное давление не только процессов репликации и транскрипции, но и трансляции. Известно, что фермент из системы редактирования РНК под названием ADAR (аденозин дезаминаза, вызывающая замены А на G в РНК) способен связывать двухцепочечную вирусную РНК в моменты, когда скорость трансляции или репликации замедляется [George C. X. et al., 2014]. Замедлиться процесс трансляции может на редких для хозяина вируса кодонах [Letzring D. P. et al., 2010]. Если это действительно так, должна наблюдаться корреляция между способностью одноцепочечной РНК образовывать вторичную структуру и частотой использования гуанина в двукратно вырожденных сайтах третьих положений кодонов (G2f3p). Такая корреляция наблюдается только в определённой области РНК-плюс цепи вируса: от кодона 600 до кодона 1730 [16]. Действительно, короткая последовательность из 12 кодонов, 5 из которых являются редкими, расположена внутри области

с корреляцией между G2f3p и процентом нуклеотидов в составе вторичной структуры РНК (в двухцепочечных фрагментах шпилек).

Процесс репликации может приостанавливаться на G-квадруплексах, большое количество которых предсказывается на РНК-плюс цепи вируса Зика [Fleming A. M. et al., 2016]. Частота предсказанных G-квадруплексов на РНК-минус цепи этого вируса значительно ниже, чем на РНК-плюс цепи [16]. Предсказываются они и в двух длинных фрагментах (от кодона 460 до кодона 1130; от кодона 1730 до кодона 3200) с корреляцией между процентом нуклеотидов во вторичной структуре (в шпильках) РНК-минус цепи и уровнем C2f3p в плюс-цепи. Таким образом, проведенный анализ свидетельствует о том, что ADAR вносит замены А на G как в РНК-плюс, так и в РНК-минус цепь вируса Зика во время пауз в процессе репликации [16].

Если в геномах вирусов Эбола и Зика направление мутационного давления соответствует наблюдаемым особенностям распределения нуклеотидов по кодирующим участкам, то на протяжении двух длинных рамок считывания парвовируса В19 направление мутационного давления не изменяется, несмотря на значительные сдвиги в частотах использования нуклеотидов [19].

Наибольший интерес для разработки ДНК-вакцин представляет определение мутационного давления в геномах аденоассоциированных вирусов (AAV) – близких родственников парвовируса В19. Между двумя длинными рамками считывания у AAV1 отсутствует терминатор транскрипции. Дифференцированная транскрипция осуществляется за счёт наличия трёх промоторов: первый расположен в некодирующей области до первой рамки считывания, второй – в середине первой рамки считывания, третий – ближе к концу той же рамки считывания [Stutika C. et al., 2016]. Вторая длинная рамка считывания перекрывается с двумя альтернативными рамками считывания для относительно коротких белков. В первой рамке считывания AAV1 частоты использования G4f и C4f близки друг к другу на протяжении первых 190 кодонов (G4f=48,19±0,77%; C4f=42,53±0,59%) [29]. После этого частота использования цитозина в четырёхкратно вырожденных сайтах резко возрастает (C4f=56,00±1,32%), достоверно превышая частоту использования гуанина (G4f=32,83±0,44%) [29].

Важно подчеркнуть, что сдвиг в частотах использования нуклеотидов произошёл в месте расположения второго промотора [29]. После третьего промотора частоты использования как гуанина, так и цитозина существенно снижаются (35,13±0,62% для C4f; 22,11±0,68% для G4f). При этом относительно высокий уровень C4f сохраняется в участке, перекрывающемся с альтернативной рамкой считывания [29].

У AAV5, однако, частота использования цитозина во второй рамке считывания настолько же высока, как и во фрагменте первой рамки считывания

между вторым и третьим промотором [29]. Причина этого, по нашему мнению [29], заключается в том, что у данного вируса сохранился терминатор транскрипции между двумя длинными рамками считывания [Qiu J. et al., 2002].

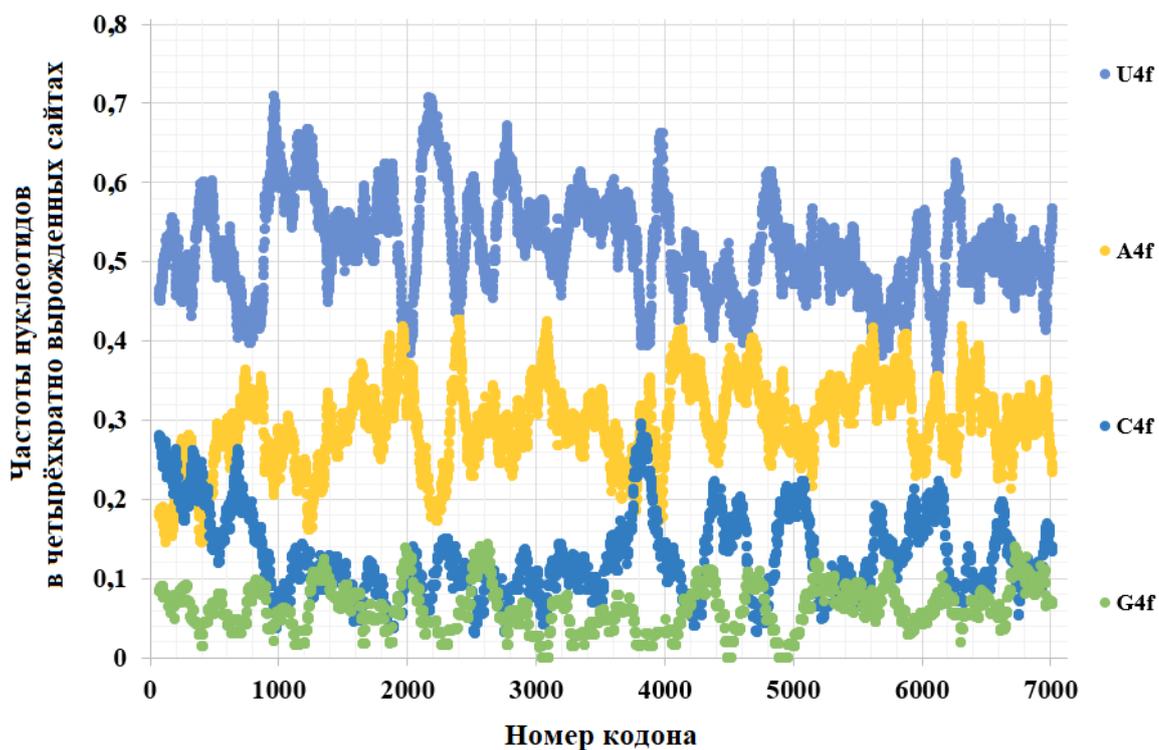
Судя по результатам, приведенным выше, по мере увеличения интенсивности транскрипции мутационное G-давление в векторе, основанном на AAV, будет сменяться на C-давление, а затем – на симметричное AT-давление [29].

В результате накопления мутаций во время транскрипции разные клетки будут экспрессировать отличающиеся друг от друга варианты внедрённого в вектор гена. Такие мутации крайне нежелательны в векторах, используемых для заместительной генной терапии. В связи с этим, в идеале, перед созданием такого препарата необходимо экспериментальным путём установить направление мутационного давления в векторе в конкретном типе клеток, а затем модифицировать нуклеотидную последовательность внедрённого гена с целью снижения вероятности возникновения в нём миссенс-мутаций [29]. Так, в случае AT-давления в векторе необходимо, насколько это возможно, повысить GC-насыщенность в третьих положениях кодонов внедрённого гена [50]. В таком случае продолжительность эффективной жизни вектора несколько увеличится.

Пандемия, вызванная новым для человеческой популяции видом коронавируса (SARS-CoV-2), привела к старту многочисленных проектов по разработке вакцины [Zhu F. C. et al., 2020; Tai W. et al., 2020] и по изучению мутагенеза этого вируса [Simmonds P., 2020]. Актуальность последних при этом обусловлена важностью полученной информации о мутагенезе для разработки качественной вакцины. Нами были изучены геномы 49 видов коронавирусов. Как выяснилось, все они отличаются повышенной частотой урацила в четырёхкратно вырожденных сайтах, что объясняется наличием у коронавирусов ферментов, обеспечивающих проверку качества работы полимеразы [32]. Все остальные повреждения азотистых оснований в РНК, кроме дезаминирования цитозина с образованием урацила, как правило, исправляются с помощью этих ферментов [Bouvet M. et al., 2012].

С РНК-плюс цепей коронавирусов транслируется только первая рамка считывания (ORF1ab), а остальные – с субгеномных РНК. Первая длинная рамка считывания фактически состоит из двух (ORF1a и ORF1b). Рибосома попадает из ORF1a в ORF1b благодаря специальному регуляторному элементу, который срабатывает в 14%–50% случаев [Baranov P. V. et al., 2005]. Величина U4f в ORF1a достоверно выше, чем в ORF1b ( $53,53 \pm 2,01$  и  $50,75 \pm 1,86$ ,  $P < 0,05$ ), что свидетельствует о том, что какая-то часть замен С на U происходит во время трансляции с РНК-плюс цепи вируса. Чем чаще фрагмент РНК-плюс цепи подвергается трансляции, тем сильнее должно быть мутационное U-давление в нём [32].

Выводы, полученные нами при сравнении частот нуклеотидов в геномах 49 видов коронавирусов, подтверждены при анализе мутаций, накопленных SARS-CoV-2 за первые 4 месяца пандемии. Наиболее частой нуклеотидной мутацией для SARS-CoV-2 является транзиция С на U [32]. Частота таких мутаций в 6 раз выше, чем частота обратных мутаций U на С в ORF1a, и в 4 раза выше – в ORF1b. Разница между частотами мутаций С на U и U на С достоверна ( $P < 0,05$ ) в обеих рамках считывания [32]. В ORF1a SARS-CoV-2 уровень U4f достоверно выше (рисунок 7), чем в ORF1b (после кодона № 4400).



Длина скользящего окна – 150 кодонов, шаг – один кодон

Рисунок 7. – Частоты нуклеотидов в четырёхкратно вырожденных сайтах на протяжении ORF1 SARS-CoV-2

Частота транзиций С на U в ORF1a достоверно выше (в 1,7 раза,  $P < 0,05$ ), чем в ORF1b, что подтверждает нашу гипотезу о накоплении этих мутаций не только во время репликации, но и во время трансляции геномной РНК-плюс цепи [32].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. В белках с различным аминокислотным составом, принадлежащих к разным структурным классам, стабилизирующими комбинациями аминокислотных остатков в наибольшей степени насыщены петли между двумя бета-тяжами, бета-тяжи между двумя альфа-спиралями, альфа-спирали между двумя бета-тяжами, альфа-спирали между альфа-спиралями и бета-тяжами.

Петли между альфа-спиралями и бета-тяжами обогащены остатками лизина и аргинина, петли между бета-тяжами и альфа-спиралями, экспонированность водному окружению которых понижена, – остатками серина и треонина, петли между двумя альфа-спиралями – остатками лейцина и тирозина. Бета-тяжи между двумя альфа-спиралями, обогащённые остатками изолейцина, демонстрируют сниженную доступность водному микроокружению. Альфа-спирали между двумя бета-тяжами достоверно обогащены остатками аланина, альфа-спирали между альфа-спиралями и бета-тяжами – остатками аргинина [5, 6, 10, 14, 22, 27, 31, 39, 47, 49].

2. Алгоритм PentaFOLD 3.0 оценивает стабильность элементов вторичной структуры по оригинальным аминокислотной и пентапептидной вероятностным шкалам, а также по дипептидным шкалам, используемым для поиска стабилизирующих комбинаций аминокислотных остатков, характерных для петель между двумя бета-тяжами, бета-тяжей между двумя альфа-спиралями, альфа-спиралей между двумя бета-тяжами и между альфа-спиралями и бета-тяжами [22, 34].

3. Синтетические вакцинные пептиды NY25, SF23 и NQ21 включают стабильные элементы вторичной структуры гемагглютинина вируса гриппа H1N1 (остатки 117–141 второго полипептида), дифтерийного токсина (остатки 508–530), белка gp120 вируса иммунодефицита человека 1 типа (остатки 94–114). Пептид NY25 образует бета-структуру и короткую альфа-спираль. Пептид SF23 образует бета-структуру, а спираль 3/10 формируется в петле при температуре выше 30°C. Пептид NQ21 образует альфа-спираль [11, 21, 23, 34, 37, 42, 45, 52].

4. Пептид CC36, лишённый амилоидогенного потенциала за счёт четырёх аминокислотных замен (V180P, F198W, M206R, V210R), соответствует наименее структурно устойчивому фрагменту прионного белка человека (остатки 179–214). Он содержит бета-структурные и короткий альфа-спиральный участки. В составе конъюгата с бычьим сывороточным альбумином в мольном соотношении 16:1 при pH=7,4 пептид CC36 находится в бета-структурной конформации. Поликлональные кроличьи антитела к рекомбинантному прионному белку человека перекрёстно реагируют с конъюгатом пептида CC36 с бычьим сывороточным альбумином [15, 34, 35, 44, 46].

5. Пептиды, соответствующие наиболее стабильным фрагментам поверхностного белка gp120 вируса иммунодефицита человека 1 типа, дифтерийного токсина, гемагглютинина вируса гриппа H1N1, образуют олигомеры, диссоциирующие при нагревании. За счёт этого они являются иммуногенными и выработанные к ним антитела способны к образованию высокоаффинных комплексов с полноразмерными белками. Конъюгат пептида CC36 с бычьим сывороточным альбумином отличается высокой иммуногенностью [11, 21, 23, 34].

6. Дифференцированная транскрипция обуславливает наличие трёх фрагментов гена SpaC коринебактерии дифтерии с разным направлением мутационного давления. Экспрессия генов микроРНК влияет на повышение GC-насыщенности отдельных экзонов гена фосфофруктокиназы зебровой амадины. В генах, кодирующих белок APC и рецептор эпидермального фактора роста человека, существует мутационное AT-давление как во время герминативного, так и во время соматического мутагенеза в раковых клетках. Содержание цитозина в генах вируса Эбола коррелирует с уровнем их покрытия во время глубокого секвенирования. Области генома вируса Зика, обогащённые гуанином в двукратно вырожденных сайтах третьих положений кодонов, подвержены ферментативному дезаминированию аденина и расположены после скоплений редких кодонов и G-квадруплексов в РНК. В генах аденоассоциированных вирусов существует обратная связь между интенсивностью транскрипции фрагментов генов и частотой использования в них гуанина и цитозина. В геномах коронавирусов мутационное U-давление возникает как во время репликации, так и во время трансляции [8, 9, 12, 13, 16, 17, 25, 29, 32, 53].

#### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

1. Оригинальный алгоритм PentaFOLD 3.0 рекомендован к использованию для осуществления поиска наиболее структурно устойчивых фрагментов белков с целью разработки пептидных вакцин на их основе [34].
2. Пептид NY25 рекомендован для дальнейших этапов разработки синтетической вакцины против вируса гриппа H1N1 на его основе [23].
3. Пептид SF23 рекомендован для дальнейших этапов разработки синтетической вакцины против дифтерии на его основе [4].
4. Пептид NQ21 рекомендован для дальнейших этапов разработки синтетической профилактической и лечебной вакцины против вируса иммунодефицита человека 1 типа на его основе [21].
5. Конъюгат пептида CC36 с бычьим сывороточным альбумином рекомендован для дальнейших этапов разработки профилактической и лечебной вакцины против прионных болезней [15].
6. Предложено проведение оптимизации частот использования синонимичных кодонов в кодирующих участках, внедрённых в вирусные векторы для генной терапии и для ДНК-вакцин, с учётом направления мутационного давления, возникающего в векторе во время транскрипции [50].

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ

## Статьи в рецензируемых журналах

1. **Khrustalev, V. V.** A blueprint for a mutationist theory of replicative strand asymmetries formation / **V. V. Khrustalev**, E. V. Barkovsky // *Current Genomics*. – 2012. – Vol. 13, № 1. – P. 55–64.
2. **Khrustalev, V. V.** *In silico* directed mutagenesis using software for glycosylation sites prediction as a new step in antigen design / **V. V. Khrustalev**, E. V. Barkovsky // *Journal of Integrated OMICS*. – 2012. – Vol. 2. – P. 31–36.
3. **Khrustalev, V. V.** Low rates of synonymous mutations in sequences of *Mycobacterium tuberculosis* GyrA and KatG genes / **V. V. Khrustalev**, M. Arjomandzandegan, E. V. Barkovsky, L. P. Titov // *Tuberculosis*. – 2012. – Vol. 92. – P. 333–344.
4. **Хрусталёв, В. В.** Вероятность воспроизведения вторичной структуры наиболее антигенных областей дифтерийного токсина в составе коротких пептидов / **В. В. Хрусталёв**, Е. В. Барковский, В. Л. Колодкина // *Здравоохранение*. – 2012. – № 10 – С. 9–12.
5. **Khrustalev, V. V.** Stabilization of secondary structure elements by specific combinations of hydrophilic and hydrophobic amino acid residues is more important for proteins encoded by GC-poor genes / **V. V. Khrustalev**, E. V. Barkovsky // *Biochimie*. – 2012. – Vol. 94, № 12. – P. 2706–2715.
6. **Khrustalev, V. V.** Random coil structures in bacterial proteins. Relationships of their amino acid compositions to flanking structures and corresponding genic base compositions / **V. V. Khrustalev**, T. A. Khrustaleva, E. V. Barkovsky // *Biochimie*. – 2013. – Vol. 95, № 9. – P. 1745–1754.
7. **Khrustalev, V. V.** Short repeats in the spa gene of *Staphylococcus aureus* are prone to nonsense mutations: stop codons can be found in strains isolated from patients with generalized infection / **V. V. Khrustalev**, E. Ghaznavi-Rad, V. Neela, M. Shamsudin, A. Amouzandeh-Nobaveh, E. V. Barkovsky // *Research in Microbiology*. – 2013. – Vol. 164, № 9. – P. 913–922.
8. **Khrustalev, V. V.** Zebra Finch glucokinase containing two homologous halves is an *in silico* chimera / **V. V. Khrustalev**, S. V. Lelevich, E. V. Barkovsky // *International Scholarly Research Notices*. – 2013. – Vol. 2013, № 790240. – P. 1–6.
9. **Khrustalev, V. V.** Intragenic isochores (intrachores) in the platelet phosphofructokinase gene of Passeriform birds / **V. V. Khrustalev**, E. V. Barkovsky, T. A. Khrustaleva, S. V. Lelevich // *Gene*. – 2014. – Vol. 546, № 1. – P. 16–24.
10. **Khrustalev, V. V.** The influence of flanking secondary structures on amino acid content and typical lengths of 3/10 helices / **V. V. Khrustalev**, E. V. Barkovsky, T. A. Khrustaleva // *International Journal of Proteomics*. – 2014. – Vol. 2014, № 360230. – P. 1–13.

11. Khrustaleva, T. A. Structural and antigenic features of the synthetic SF23 peptide corresponding to the receptor binding fragment of diphtheria toxin / T. A. Khrustaleva, V. V. Khrustalev, E. V. Barkovsky, V. L. Kolodkina, A. A. Astapov // *Molecular Immunology*. – 2015. – Vol. 63, № 2. – P. 235–244.

12. Khrustalev, V. V. Opposite nucleotide usage biases in different parts of the *Corynebacterium diphtheriae* spaC gene / V. V. Khrustalev, E. V. Barkovsky, V. L. Kolodkina, T. A. Khrustaleva // *International Journal of Bioinformatics Research and Applications*. – 2015. – Vol. 11, № 4. – P. 347–365.

13. Khrustalev, V. V. Local mutational pressures in genomes of Zaire ebolavirus and Marburg virus / V. V. Khrustalev, E. V. Barkovsky, T. A. Khrustaleva // *Advances in Bioinformatics*. – 2015. – Vol. 2015, № 678587 – P. 1–14.

14. Khrustalev, V. V. Magnesium and manganese binding sites on proteins have the same predominant motif of secondary structure / V. V. Khrustalev, E. V. Barkovsky, T. A. Khrustaleva // *Journal of Theoretical Biology*. – 2016. – Vol. 395. – P. 174–185.

15. Khrustalev, V. V. The part of a long beta hairpin from the scrapie form of the human prion protein is reconstructed in the synthetic CC36 protein / V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, K. Szpotkowski, V. V. Poboinev, K. Y. Kakhanouskaya // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2016. – Vol. 84. – P. 1462–1479.

16. Khrustalev, V. V. Mutational pressure in Zika virus: Local ADAR-editing areas associated with pauses in translation and replication / V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, N. Sharma, R. Giri // *Frontiers in Cellular and Molecular Microbiology*. – 2017. – Vol. 7, №. 44 – P. 1–17.

17. Хрусталёв, В. В. Скорость эволюции гена APC, кодирующего белок, препятствующий развитию колоректального рака // В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва // *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук*. – 2017. – № 2. – С. 121–126.

18. Побойнев, В. В. Особенности аминокислотного состава альфа-спиральных участков в полипептидных цепях белков различных структурных классов // В. В. Побойнев, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва // *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. – 2017. – № 4. – С. 58–66.

19. Khrustalev, V. V. Transcription-associated mutational pressure in the Parvovirus B19 genome: Reactivated genomes contribute to the variability of viral populations / V. V. Khrustalev, M. A. Ermalovich, J. M. Hubschen, T. A. Khrustaleva // *Journal of Theoretical Biology*. – 2017. – Vol. 435. – P. 199–207.

20. Khrustalev, V. V. Ethanol binding sites on proteins / V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, S. V. Lelevich // *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. – 2017. – Vol. 78. – P. 187–194.

21. **Khrustalev, V. V.** The alpha helix 1 from the first conserved region of HIV1 gp120 is reconstructed in the short NQ21 peptide / **V. V. Khrustalev**, T. A. Khrustaleva, E. Y. Kahanouskaya, Y. A. Rudnichenko, H. V. Bandarenka, A. M. Arutyunyan, K. V. Girel, N. V. Khinevich, A. L. Ksenofontov, L. V. Kordyukova // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2018. – Vol. 638. – P. 66–75.

22. **Khrustalev, V. V.** Amino acid content of beta strands and alpha helices depends on their flanking secondary structure elements / **V. V. Khrustalev**, T. A. Khrustaleva, V. V. Poboinev // *Biosystems*. – 2018. – Vol. 168. – P. 45–54.

23. **Khrustalev, V. V.** Selection and structural analysis of the NY25 peptide – A vaccine candidate from hemagglutinin of swine-origin Influenza H1N1 / **V. V. Khrustalev**, T. A. Khrustaleva, L. V. Kordyukova // *Microbial Pathogenesis*. – 2018. – Vol. 125. – P. 72–83.

24. Побойнев, В. В. Стабильность альфа-спиральных и бета-структурных блоков в белках четырех структурных классов / В. В. Побойнев, **В. В. Хрусталёв**, Т. А. Хрусталёва, А. Н. Стожаров // *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. – 2018. – № 4. – С. 391–400.

25. **Khrustalev, V. V.** Mutational pressure and natural selection in epidermal growth factor receptor gene during germline and somatic mutagenesis in cancer cells / **V. V. Khrustalev**, T. A. Khrustaleva, V. V. Poboinev, K. V. Yurchenko // *Mutation Research*. – 2019. – Vol. 815. – P. 1–9.

26. **Khrustalev, V. V.** Microenvironment of tryptophan residues in proteins of four structural classes: applications for fluorescence and circular dichroism spectroscopy / **V. V. Khrustalev**, V. V. Poboinev, A. N. Stojarov, T. A. Khrustaleva // *European Biophysics Journal*. – 2019. – Vol. 48. – P. 523–537.

27. **Khrustalev, V. V.** Cobalt (II) cation binding by proteins / **V. V. Khrustalev**, T. A. Khrustaleva, V. V. Poboinev, C. I. Karchevskaya, E. A. Shablovskaya, T. G. Terechova // *Metallomics*. – 2019. – Vol. 11. – P. 1743–1752.

28. Побойнев, В. В. Структурные переходы в смешанных классах белков / В. В. Побойнев, **В. В. Хрусталёв**, Т. А. Хрусталёва, А. Н. Стожаров // *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. – 2019. – № 3. – С. 326–337.

29. **Khrustalev, V. V.** The history of mutational pressure changes during the evolution of adeno-associated viruses: A message to gene therapy and DNA-vaccine vectors designers / **V. V. Khrustalev**, T. A. Khrustaleva, A. N. Stojarov, N. Sharma, B. Bhaskar, R. Giri // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2020. – Vol. 77, № 104100. – P. 1–10.

30. Kordyukova, L. V. Differential S-acylation of enveloped viruses / L. V. Kordyukova, M. V. Serebryakova, **V. V. Khrustalev**, M. Veit // *Protein and Peptide Letters*. – 2019. – Vol. 26. – P. 588–600.

31. **Khrustalev, V. V.** Random coils of proteins situated between a beta strand and an alpha helix demonstrate decreased solvent accessibility / **V. V. Khrustalev** // *The Protein Journal*. – 2020. – Vol. 39. – P. 308–317.

32. **Khrustalev, V. V.** Translation-associated mutational U-pressure in the first ORF of SARS-CoV-2 and other coronaviruses / **V. V. Khrustalev**, R. Giri, T. A. Khrustaleva, S. K. Kapuganti, A. N. Stojarov // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 11, № 559165. – P. 1–13.

33. Kordyukova, L. V. Filamentous versus spherical morphology: a case study of the recombinant A/WSN/33 (H1N1) virus / L. V. Kordyukova, R. R. Mintaev, A. A. Rtishchev, M. S. Kunda, N. N. Ryzhova, S. S. Abramchuk, M. V. Serebryakova, **V. V. Khrustalev**, T. A. Khrustaleva, V. V. Poboinev, S. G. Markushin, O. L. Voronina // *Microscopy and Microanalysis*. – 2020. – Vol. 26. – P. 297–309.

34. **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 and Peptide Letters*. – 2021. – Vol. 28, № 5. – P. 573–588.

35. **Khrustalev, V. V.** Spectra of tryptophan fluorescence are the result of co-existence of certain most abundant stabilized excited state and certain most abundant destabilized excited state / **V. V. Khrustalev**, T. A. Khrustaleva, V. V. Poboinev, A. N. Stojarov, L. V. Kordyukova, A. A. Akunevich // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2021. – Vol. 257, № 119784. – P. 1–13.

#### **Статьи в сборниках научных трудов и материалах конференций**

36. Lelevich, S. V. Deep insights into the history of hexokinases evolution based on mutational pressure theory / S. V. Lelevich, **V. V. Khrustalev**, E. V. Barkovsky // *Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'13) : Proceedings, Moscow, 25–28 July 2013 / Moscow State University*. – Moscow, 2013. – № 125. – P. 1.

37. **Хрусталёв, В. В.** Термический анализ пептида SF23 – потенциального компонента вакцины против дифтерии / **В. В. Хрусталёв**, Т. А. Хрусталёва, Ю. А. Рудниченко // *Инновации в медицине и фармации 2015 : материалы дистанционной науч.-практ. конф. студентов и молодых учёных, Минск, 7 дек. 2015 г. / Бел. гос. мед. ун-т ; под ред. А. В. Сикорского, О. К. Дорониной, Е. В. Барковского, Т. В. Тереховой*. – Минск, 2015. – С. 627–632.

38. Побойнев, В. В. Докинг пептидов с большим прионным белком человека / В. В. Побойнев, **В. В. Хрусталёв**, Т. А. Хрусталёва, Е. В. Барковский // *Инновации в медицине и фармации 2015 : материалы дистанционной науч.-практ. конф. студентов и молодых учёных, Минск, 7 дек. 2015 г. / Бел. гос. мед. ун-т ; под ред. А. В. Сикорского, О. К. Дорониной, Е. В. Барковского, Т. В. Тереховой*. – Минск, 2015. – С. 594–599.

39. **Хрусталёв, В. В.** О вкладе специфических чередований гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков в формирование элементов вторичной структуры белков / **В. В. Хрусталёв**, В. В. Побойнев, Т. А. Хрусталёва // *Фундаментальная наука в современной медицине 2016 : материалы сателл. дистанционной науч.-практ. конф. студентов и молодых учёных*, Минск, 7 марта 2016 г. / Бел. гос. мед. ун-т ; под ред. А. В. Сикорского, О. К. Дорониной, Т. В. Тереховой. – Минск, 2016. – С. 312–317.

40. **Хрусталёв, В. В.** Поиск консервативных фрагментов с устойчивой вторичной структурой в неструктурированной части белка Adenomatous Polyposis Coli / **В. В. Хрусталёв**, Т. А. Хрусталёва, Е. С. Барашкова // *Современные проблемы биохимии = Current problems in Biochemistry : сб. науч. ст. / НАН Беларуси [и др.] ; редкол.: Л. И. Надольник (гл. ред.) [и др.] : в 2 ч. – Гродно, 2016. – Ч. 2. – С. 45–50.*

41. **Хрусталёв, В. В.** Сравнительный анализ межспиральных взаимодействий в структурах  $\mu$ -опиоидного рецептора, связанного с агонистом и антагонистом / **В. В. Хрусталёв**, Т. А. Хрусталёва, М. В. Скоробогатый, Е. А. Деменчук // *БГМУ в авангарде медицинской науки и практики : сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Бел. гос. мед. ун-т ; редкол.: А. В. Сикорский, О. К. Дорониной. – Минск, 2016. – Вып. 6. – С. 265–271.*

42. **Хрусталёв, В. В.** Строение олигомеров пептида SF23 / **В. В. Хрусталёв**, В. Л. Колодкина, Е. Ю. Кохановская, Т. А. Хрусталёва // *Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии ; под ред. Л. П. Титова. – Минск, 2016. – Вып. 9. – С. 214–217.*

43. **Хрусталёв, В. В.** Изменчивость сайтов N-гликозилирования гемагглютинаина пандемического вируса гриппа H1N1 // **В. В. Хрусталёв**, Т. А. Хрусталёва, В. В. Побойнев // *Биохимия и молекулярная биология : сб. науч. ст. – Минск, 2017. – С. 39–47.*

44. Хрусталёва, Т. А. Амилоидогенный потенциал аминокислотных замен в прионном пептиде СС36 / Т. А. Хрусталёва, **В. В. Хрусталёв**, В. В. Побойнев // *Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии : сб. материалов III конф. молодых ученых биохимиков и молекулярных биологов с международным участием*, Гродно, 11–12 мая 2017 г. / НАН Беларуси [и др.] ; отв. ред. Л. И. Надольник. – Гродно, 2017. – С. 130–133.

45. **Хрусталёв, В. В.** Роль водного окружения в формировании вторичной структуры пептида NQ21 / **В. В. Хрусталёв**, Т. А. Хрусталёва, Г. Н. Лысенко, В. В. Побойнев, А. Н. Стожаров // *Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии : сб. ст. II Белорусского биохимического конгресса*, Гродно, 17–18 мая 2018 г. / НАН Беларуси [и др.] ; под общ. ред. доктора мед.

наук, проф. И. Н. Семенени и доктора биол. наук, проф., члена-корр. НАН Беларуси А. Г. Мойсеенка. – Минск, 2018. – С. 605–613.

46. **Хрусталёв, В. В.** Олигомеры аттенуированного прионного пептида СС36 диссоциируют при нагревании: спектроскопическое исследование / **В. В. Хрусталёв**, Т. А. Хрусталёва, А. М. Арутюнян, Л. В. Кордюкова, В. В. Побойнев // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине : сб. науч. тр. Всероссийской науч.-практ. конф. с международным участием, Санкт-Петербург, 3 декабря 2020 г. : в 2 ч. / СЗГМУ им. И. И. Мечникова ; под ред. А. В. Силина, Л. Б. Гайковой. – СПб, 2020. – Ч. 2. – С. 224–230.

### Тезисы докладов

47. **Khrustalev, V. V.** Amino acid content of alpha helices and beta strands depends on their flanking structures: development of a new ab-initio algorithm for secondary structure prediction / **V. V. Khrustalev**, Т. А. Khrustaleva, V. V. Poboinev // 5<sup>th</sup> International Congress on Analytical Proteomics : ICAP 2017 Proceedings Book, Caparica, 3–6 July 2017 / Proteomass ; edited by M. Silva [et al.]. – Caparica, 2017. – P. 206–207.

48. Побойнев, В. В. Термодинамическая характеристика стабильности структуры белков четырёх классов / В. В. Побойнев, **В. В. Хрусталёв**, А. Н. Стожаров, Т. А. Хрусталёва // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : междунар. науч. конф. ; 13-й съезд Белорус. обществ. объединения фотобиологов и биофизиков : тез. докл., Минск, 27–29 июня 2018 г. / Белорус. гос. ун-т ; редкол.: И. Д. Волотовский (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2018. – С. 34.

49. **Хрусталёв, В. В.** Доступность растворителю элементов вторичной структуры белков / **В. В. Хрусталёв**, А. Н. Стожаров, В. В. Побойнев, Т. А. Хрусталёва // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : междунар. науч. конф. ; 13-й съезд Белорус. обществ. объединения фотобиологов и биофизиков : тез. докл., Минск, 27–29 июня 2018 г. / Белорус. гос. ун-т ; редкол.: И. Д. Волотовский (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2018. – С. 44.

50. Акуневич, А. А. Оптимизация нуклеотидного состава генов НЛА и  $\beta 2$ -микроглобулина с помощью оригинального компьютерного алгоритма / А. А. Акуневич, **В. В. Хрусталёв** // Физико-химическая биология как основа современной медицины : тез. докл. участников Республ. конф. с междунар. участием, посвящ. 110-летию со дня рождения В. А. Бандарина, Минск, 24 мая 2019 г. : в 2 ч. / Бел. гос. мед. ун-т ; под ред. В. В. Хрусталёва, Т. А. Хрусталёвой. – Минск, 2019. – Ч. 1. – С. 24–25.

51. **Хрусталёв, В. В.** Сравнительный анализ трёхмерных структур гемагглютинаина вируса гриппа подтипов Н1 и Н3 / **В. В. Хрусталёв**, Т. А. Хрусталёва, А. Р. Козел, В. А. Козел, В. В. Побойнев, Д. Насер Аль Дин, П. Кушнир, Л. В. Кордюкова // Физико-химическая биология как основа современной медицины : тез. докл. участников Республ. конф. с междунар. участием, посвящ. 110-летию со дня рождения В. А. Бандарина, Минск, 24 мая 2019 г. : в 2 ч. / Бел. гос. мед. ун-т ; под ред. В. В. Хрусталёва, Т. А. Хрусталёвой. – Минск, 2019. – Ч. 2. – С. 130–131.

52. **Хрусталёв, В. В.** Метод обработки карт спектров гигантского комбинационного рассеяния / **В. В. Хрусталёв**, А. В. Бондаренко, Н. В. Хиневич, Т. А. Хрусталёва // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : тез. докл. междунар. науч. конф. ; 14-го съезда Белорус. обществ. объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 17–19 июня 2020 г. / Белорус. гос. ун-т ; редкол.: И. Д. Волотовский (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2020. – С. 59.

53. **Хрусталёв, В. В.** Мутационное давление в гене Adenomatous polyposis coli в опухолевых клетках / В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва, А. Н. Стожаров, С. В. Ткачёв // Физико-химическая биология как основа современной медицины : тез. докл. участников Республ. конф. с междунар. участием, посвящ. 80-летию со дня рождения Т. С. Морозкиной, Минск, 29 мая 2020 г. / Бел. гос. мед. ун-т ; под ред. А. Д. Тагановича, В. В. Хрусталёва, Т. А. Хрусталёвой. – Минск, 2020. – С. 214–215.

## РЭЗІЮМЭ

**Хрусталёў Уладзіслаў Віктаравіч**

### **Стабільнасць структуры бялкоў і вакцынных пептыдаў**

**Ключавыя словы:** другасная структура бялку; альфа-спіраль; бэта-цяж; пятля; гемаглютынін; вірус грыпу H1N1; дыфтэрыіны таксін; gp120; вірус імунадэфіцыту чалавека 1 тыпу; прыонны бялок чалавека; фосфафруктакіназа; вірус Эбала; вірус Зіка; адэнаасацыяваныя вірусы; SARS-CoV-2.

**Мэта работы:** выявіць заканамернасці стабілізацыі альфа-спіраляў, бэта-цяжаў і пяцель у малекулах бялкоў і распрацаваць на гэтай аснове метады адбору эпітопаў для стварэння пептыдных вакцын.

**Метады даследавання:** біяінфарматычны аналіз, цвердафазны хімічны сінтэз, спектраскапія кругавога дыхраізму, флюарэсцэнтная спектраскапія, спектраскапія камбінацыйнага рассеяння, афінная храматаграфія.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна.** У выніку аналізу 1730 трохвымерных структур бялкоў знойдзены найбольш стабільныя тыпы элементаў другаснай структуры, атрыманы арыгінальныя імавернасныя шкалы, на якіх заснаваны алгарытм PentaFOLD 3.0. З дапамогай створанага алгарытму знойдзены фрагменты гемаглютыніна віруса грыпу H1N1, дыфтэрыйнага таксіну і бялку gp120 віруса імунадэфіцыту чалавека 1 тыпу, якія вылучаюцца найбольш стабільнымі элементамі другаснай структуры, і сканструяваны сінтэтычныя пептыды (NY25, SF23 і NQ21 адпаведна), другасная структура якіх адпавядае такой для фрагментаў поўнаразмерных бялкоў, паводле даных спектраскапіі кругавога дыхраізму і камбінацыйнага рассеяння. Знойдзены найбольш схільны да пераходу з альфа-спіральнага ў бэта-структурны стан фрагмент прыоннага бялку чалавека: у адпаведным пептыдзе CC36 быў рэпрадуктаваны фрагмент бэта-шпількі з паталагічнай формы прыоннага бялку, але амілоідагенныя якасці самога пептыду атэнуіраваны чатырма амінакіслотнымі заменамі. Антыцелы да пептыдаў NY25, SF23 і NQ21 здольны ствараць высокаафінныя комплексы з поўнаразмернымі бялкамі. Устаноўлены факт залежнасці напрамку і частаты нуклеатыдных мутацый у генах і іх фрагментах ад інтэнсіўнасці іх транскрыпцыі (для эукарыёт, бактэрыяў і вірусаў) і трансляцыі (для РНК-плюс вірусаў). Рэкамендавана лічыць выкарыстанне сінтэтычных пептыдаў у якасці антыгенаў больш бяспечным спосабам імунізацыі, чым ужыванне ДНК- і РНК-вакцын, пад час транскрыпцыі і трансляцыі якіх непазбежна ўзнікненне нуклеатыдных мутацый.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** створаны метады рэкамендаваны да выкарыстання з мэтай павышэння эфектыўнасці сінтэтычных пептыдных вакцын.

**Галіна прымянення:** біяхімія, вылічальная біялогія, вакцыналогія, імуналогія, біяфізіка.

## РЕЗЮМЕ

**Хрусталёв Владислав Викторович**

### **Стабильность структуры белков и вакцинных пептидов**

**Ключевые слова:** вторичная структура белка; альфа-спираль; бета-тяж; петля; гемагглютинин; вирус гриппа H1N1; дифтерийный токсин; gp120; вирус иммунодефицита человека 1 типа; прионный белок человека; фосфофруктокиназа; вирус Эбола; вирус Зика; аденоассоциированные вирусы; SARS-CoV-2.

**Цель работы:** установить закономерности стабилизации альфа-спиралей, бета-тяжей и петель в молекулах белков и разработать на этой основе метод отбора эпитопов для создания пептидных вакцин.

**Методы исследования:** биоинформатический анализ, твердофазный химический синтез, спектроскопия кругового дихроизма, флюоресцентная спектроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния, аффинная хроматография.

**Полученные результаты и их новизна.** В результате анализа 1730 трёхмерных структур белков найдены наиболее стабильные типы элементов вторичной структуры, получены оригинальные вероятностные шкалы, на которых основан алгоритм PentaFOLD 3.0. С помощью созданного алгоритма найдены фрагменты гемагглютинина вируса гриппа H1N1, дифтерийного токсина и белка gp120 вируса иммунодефицита человека 1 типа, отличающиеся наличием наиболее стабильных элементов вторичной структуры, и сконструированы синтетические пептиды (NY25, SF23 и NQ21 соответственно), вторичная структура которых соответствует таковой для фрагментов полноразмерных белков, согласно данным спектроскопии кругового дихроизма и комбинационного рассеяния. Найден наиболее склонный к переходу из альфа-спирального в бета-структурное состояние фрагмент прионного белка человека: в соответствующем пептиде СС36 воспроизвёлся фрагмент бета-шпильки из патологической формы прионного белка, но амилоидогенные свойства самого пептида аттенуированы четырьмя аминокислотными заменами. Антитела к пептидам NY25, SF23 и NQ21 способны образовывать высокоаффинные комплексы с полноразмерными белками. Установлен факт зависимости направления и частоты нуклеотидных мутаций в генах и их фрагментах от интенсивности их транскрипции (для эукариот, бактерий и вирусов) и трансляции (для РНК-плюс вирусов). Рекомендовано признать использование синтетических пептидов в качестве антигенов более безопасным способом иммунизации, чем применение ДНК- и РНК-вакцин, при транскрипции и трансляции которых неизбежно возникновение нуклеотидных мутаций.

**Рекомендации по использованию:** созданный метод рекомендован к использованию для повышения эффективности синтетических пептидных вакцин.

**Область применения:** биохимия, вычислительная биология, вакцинология, иммунология, биофизика.

## SUMMARY

**Khrustalev Vladislav Victorovich**

### **Stability of the structure of proteins and vaccine peptides**

**Key words:** secondary structure of proteins; alpha helix; beta strand; random coil; hemagglutinin; Influenza H1N1 virus; diphtheria toxin; gp120; human immunodeficiency virus type 1; human prion protein; phosphofructokinase; Ebola virus; Zika virus; adeno-associated viruses; SARS-CoV-2.

**The aim of the study:** to establish the regularities of stabilization of alpha helices, beta strands, and random coils in molecules of proteins; and to develop on that basis the method for the selection of epitopes for peptide vaccines creation.

**Research methods:** bioinformatical analysis, solid phase chemical synthesis, circular dichroism spectroscopy, fluorescent spectroscopy, surface enhanced Raman spectroscopy, affine chromatography.

**Obtained results and their novelty.** The most stable types of secondary structure elements have been found after the analysis of 1730 three-dimensional structures of proteins, original propensity scales have been created, and the PentaFOLD 3.0 algorithm has been developed. With the help of the developed algorithm the fragments of Influenza H1N1 virus hemagglutinin, diphtheria toxin, and gp120 of human immunodeficiency virus type I that include the most stable elements of secondary structure have been found, and synthetic peptides (NY25, SF23, and NQ21, respectively) have been constructed. Secondary structures of the corresponding fragments of full-length proteins have been reproduced in those peptides, according to the results of circular dichroism and surface enhanced Raman spectroscopy. The fragment of human prion protein that is prone to the shift from alpha-helical to beta-structural state has been found: the corresponding CC36 peptide contains a fragment of beta-hairpin from the pathological form of prion, but its amyloidogenic properties are attenuated by the four amino acid substitutions. Antibodies against peptides NY25, SF23, and NQ21 were proved to be able to form high affinity complexes with full-length proteins. The fact of the dependence of the direction and the rate of nucleotide mutations in genes and their fragments on the intensity of their transcription (for eukaryotes, bacteria, and viruses) and their translation (for RNA plus viruses) has been approved. It was recommended to claim that the usage of synthetic peptides as antigens for immunization is more harmless than the usage of DNA and RNA vaccines, since it is impossible to avoid the occurrence of nucleotide mutations during transcription and translation of the latter ones.

**Recommendations for the usage:** developed method is recommended for the usage with the aim to enhance the efficacy of synthetic peptide vaccines.

**Field of application:** biochemistry, computational biology, vaccinology, immunology, biophysics.

Подписано в печать 22.10.21. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Хероx office».  
Ризография. Гарнитура «Times».  
Усл. печ. л. 2,56. Уч.-изд. л. 2,86. Тираж 60 экз. Заказ 524.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования  
«Белорусский государственный медицинский университет».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.  
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.