

УДК 577.114.4, 577.151.45, 544.165

АНАЛИЗ ТРАЕКТОРИИ ОБРАЗОВАНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНОГО ГЛИКОЗИЛФЕРМЕНТА В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА А МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ*

© 2020 Е.М. Кирилин^{1**}, В.К. Швядас^{1,2**}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия; электронная почта: kirilin@belozersky.msu.ru; vyas@belozersky.msu.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.02.2020

После доработки 02.03.2020

Принята к публикации 02.03.2020

Комплексное использование методов классической молекулярной динамики, симуляции титрования ионизируемых остатков, метадинамики, а также комбинированного метода квантовой механики/молекулярной механики позволило выявить альтернативный путь образования промежуточного гликозилфермента в механизме действия нейраминидазы вируса гриппа А H5N1. Ключевую роль в механизме обеспечивает остаток Asp151, расположенный на подвижной петле и позволяющий реализовать каталитическую функцию фермента в широком интервале рН окружающей среды благодаря формированию сети взаимодействий с молекулами воды. Так как размножение гриппа у птиц проходит в условиях пищеварительной системы при низких значениях рН, а у человека – в дыхательных путях в условиях близких к нейтральным, существование альтернативных путей протекания реакции при разной кислотности среды может опосредовать двойной тропизм вируса и циркуляцию специфических штаммов вируса H5N1, склонных к передаче от птиц к человеку.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: грипп, нейраминидаза, гликозилфермент.

DOI: 10.31857/S0320972520040090

Высокопатогенные штаммы вируса гриппа H5N1 («птичий грипп») представляют серьезную проблему не только для популяций диких и одомашненных птиц, но и способны вызывать вспышки заболевания среди людей (смертность ~60%). Несмотря на то что по данным Всемирной организации здравоохранения пик инфекции наблюдали с 1998 по 2015 гг. [1], до сих пор выясняют детали адаптации вируса к человеку [2], т.к. проявление двойного тропизма вируса (птица/человек) представляет чрезвычайно опасный путь вирусной эволюции. Заражение, как правило, происходит путем взаимодействия вируса с клеткой хозяина через гликановые рецепторы клеточной мембраны – олигосахаридные фрагменты с концевой сиаловой кислотой. Фермент нейраминидаза, являясь одним из клю-

чевых инструментов в жизнедеятельности вируса, обеспечивает гидролиз сиалированных гликанов для последующего высвобождения созревших новых вирионов гриппа. Совместно с другим белком – гемагглютинином, ответственным за первичное распознавание гликанов, а, соответственно, и клетки хозяина, нейраминидаза формирует базовый механизм вирулентности гриппа [3]. В зависимости от антигенных свойств различают девять типов нейраминидаз, разделенных на две группы: группа 1 содержит нейраминидазы N1, N4, N5 и N8 и группа 2 – N2, N3, N6, N7 и N9 [4]. Одной из особенностей нейраминидаз штамма H5N1, обнаруженного у людей и птиц, является их низкая активность при сильноокислых значениях рН [5], тогда как нейраминидазы остальных штаммов гриппа птиц сохраняют высокую активность в сильноокислых средах, т.к. распространение вируса у птиц происходит в пищеварительном тракте. Большинство сезонных человеческих штаммов также малоактивны при низких значениях рН [6, 7], поскольку размножение вируса у человека адаптировано к условиям дыхательных путей,

Принятые сокращения: комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики – КМ/ММ.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ20-030, 01.04.2020.

** Адресат для корреспонденции.

где в норме поддерживается уровень рН близкий к нейтральным (рН 6,5–7,0) или слабокислым значениям (рН 5,7–6,0) [8]. Таким образом, адаптация нейраминидаз H5N1 штаммов у птиц, по всей видимости, приблизила их по своим свойствам к нейраминидазам сезонных штаммов гриппа человека, что может обуславливать высокую вероятность прямой передачи вируса от птиц к людям. Установлено, что для семейства гликозидаз GN34, к которому относится и нейраминидаза вируса гриппа, характерен каталитический гидролиз углеводов по механизму двойного замещения [9, 10]. На этапе образования промежуточного ковалентного гликозилфермента один из каталитических остатков (Tyr406, активируемый Glu277) выступает в роли нуклеофила, а второй – Asp151, в качестве донора протона для стабилизации уходящей группы. Данный механизм накладывает специфические требования к функционированию остатка Asp151 в нейтральных условиях кислотности среды. Микросреда активного центра фермента, характер окружающей остатков и изолированность от внешнего раствора может изменить кислотно-основные свойства карбоксильной группы. Подобный механизм был показан для некоторых гликозидаз, когда при связывании олигосахаридного субстрата активный центр фермента закрывается с вытеснением молекул растворителя, и остаток Asp151 в протонированной форме может непосредственно взаимодействовать с уходящей группой [11]. Однако, по данным рентгеноструктурного анализа, остаток Asp151 в нейраминидазе штамма H5N1 располагается на так называемой подвижной петле-150 (а.о. 147–152) [4] в области сайта связывания субстрата, напрямую доступен растворителю и, казалось бы, не может выполнять необходимую функциональную роль при значениях рН окружающей среды 5,7–6,5.

Каким образом обеспечивается выполнение функции остатка Asp151 в каталитическом действии нейраминидазы штамма H5N1 вируса гриппа в нейтральной среде? Как связывание олигосахаридного субстрата в активном центре фермента влияет на значение pK_a остатка Asp151? Каково конформационное состояние субстрата в активном центре, соответствующее наиболее эффективному протеканию ферментативной реакции и формированию промежуточного гликозилфермента? В настоящей работе мы попытались ответить на эти вопросы, используя комплексный подход, объединяющий возможности методов классической молекулярной динамики, метадинамики, а также комбинированного метода квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ) и симуляции титрования ионизируемых остатков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение структуры субстрата. В качестве субстрата использовали трисахарид – α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -Glc-O-Me – характерный терминальный структурный фрагмент гликановых рецепторов птиц. Структура этого соединения была получена с помощью сервера Glycam Biomolecule Builder [12] при использовании силового поля Amber.

Двугранные углы гликозидных связей. Двугранные углы гликозидных связей определяли следующим образом, начиная с терминального остатка сиаловой кислоты: ϕ_1 и ψ_1 , ϕ_2 и ψ_2 . ϕ_1 и ψ_1 определяли по атомам O-C2-O3-C3 и C2-C3-O3-C2, ϕ_i и ψ_i остальных гликозидных связей были определены как O-C1-O4'-C4' и C1-O4'-C4'-C3 для 1→4 связей и O-C1-O3'-C3' и C1-O3'-C3'-C2' для 1→3 связей, апострофом обозначен невозстанавливающий конец гликозидной связи.

Молекулярная динамика. Для подготовки субстратов была использована программа leap пакета AmberTools [13]. Для фермента и фермент-субстратных комплексов была создана система, включающая растворитель TIP3P [14], с расстоянием от стенок куба до молекулы субстрата не менее 15 Å. Для создания условий, приближенных к физиологическим, в систему помещали ионы Cl⁻ и Na⁺ (до достижения 0,1 М концентраций). Суммарный заряд системы сводили к нулю при добавлении дополнительных ионов. Для каждой системы проводили минимизацию энергии (2500 шагов), последующий нагрев до 300 К в течение 60 пс, снятие ограничений с тяжелых атомов в течение 290 пс и релаксацию в течение 5 нс в NPT ансамбле (постоянное число частиц, давление и температура) с постепенным доведением плотности до постоянного значения 1,04 г/см³. Стандартные симуляции в растворе осуществляли в пакете Amber14 при температуре 300 К, шаге интегрирования 2 фс в условиях NVT ансамбля (постоянное число частиц, температура и объем). Температуру системы регулировали с использованием термостата Ланжевена [15]. Продолжительность каждой траектории составляла 1 микросекунду, кадры динамики сохраняли каждые 10 пс.

Метод ускоренной молекулярной динамики был проведен посредством встроенных функций пакета Amber14 с использованием параметров, идентичных вышеуказанным, а также заданием специфических методов значений (EthreshD 13,42; alphaD 3,2; EthreshP –20 203,56; alphaP 602,24).

Метадинамика. Расчет метадинамики выполняли на базе пакета Amber14, модифициро-

ванном PLUMED (версия 2.5) [16]. Высота добавочных Гауссовских потенциалов была определена начальным значением 0,6 ккал/моль, ширина – 0,01 или 0,0075 для переноса протона. Новые потенциалы добавляли через каждые 100 шагов динамики при шаге интегрирования 0,25 фс. Температура симуляции составляла 300 К. Коллективные переменные с двух сторон ограничивали квадратичным потенциалом на значение координационного числа вокруг атома кислорода уходящей группы на расстоянии 7 Å. Для ускорения расчета использовали технологию из 10 параллельных вычислений, объединенных общим добавленным потенциалом метадинамики [17].

Комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики. Вычисления КМ/ММ проводили на базе пакета AmberTools. Для описания квантового региона использовали метод SCC-DFTB, который хорошо себя зарекомендовал при КМ/ММ моделировании реакций, катализируемых другими ферментами семейства сиалидаз [18, 19]. В квантовый регион включали остатки Tyr406, Glu277, Arg292, Asp151, мономеры сиаловой кислоты и следующей за ней галактозы, а также 14 молекул воды в радиусе 7 Å от атома кислорода уходящей группы при образовании ковалентного гликозил-фермента.

Симуляция титрования ионизируемых остатков в явном растворителе. Метод pH-REMD, имплементированный в Amber14, использовали для расчета значений pK_a Asp151, симуляцию 12 реплик проводили в интервале pH от 2 до 7,5. Обмен репликами осуществлялся каждые 5000 шагов, попытка перепротонирования – каждые 200 шагов и релаксация – в течение 300 шагов. Значения pK_a остатка рассчитывали по адаптированному уравнению Хендерсона–Хассельбаха, учитывая рассчитанную вероятность образования депротонированной и протонированной форм остатка [20].

Методы кластеризации. Кластеризацию структуры субстрата проводили на базе значений двугранных углов между углеводными мономерами с использованием следующей модификации:

отображение фазового пространства углов u_i – в общем случае L -мерного бокса P_c :

$$P_c = \{u \in R^L; 0 \leq u_i < 2\pi\}, 1 \leq i < L,$$

посредством преобразования:

$$F_c(u) = \left(\frac{1}{\sqrt{L}} \cos u_1, \frac{1}{\sqrt{L}} \sin u_1, \dots, \frac{1}{\sqrt{L}} \cos u_L, \frac{1}{\sqrt{L}} \sin u_L \right).$$

Продуктом отображения является тор T^L – L -мерная поверхность на единичной сфере S^{2L-1} . Отображение является локальной изометрией с сохранением меры расстояний [21].

Преобразованные переменные использовали для кластеризации с помощью Байесовского непараметрического метода, имплементированного в программе dpMMlowVar [22]. Оптимизацию углового параметра для данного метода проводили в пределах $[-0,6; -0,3]$ с шагом 0,01 на основании оценочной функции силуэта. При визуализации результатов кластеризации использовали метод главных компонент для трансформированных значений углов с выделением первых трех главных компонент.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Расчет pK_a Asp151. Определение сдвига pK_a остатка Asp151 в активном центре нейраминидазы N1 при связывании субстрата проводили с использованием КМ/ММ в явном растворителе и расчетов электростатического поля Пуассона–Больцмана по дискретной модели протонирования, которая учитывает состояние ионизации исследуемого остатка в зависимости от его текущей ориентации, доступности растворителя и кислотности окружающей среды. Метод позволяет проводить ряд параллельных симуляций в широком интервале значений pH. В ходе эксперимента проводится семплирование системы, в которой предусмотрены динамические переходы между конформациями с протонированной и непротонированной формой карбоксильной группы остатка Asp151. Так как нейраминидаза функционирует в виде тетрамера, расчет pK_a аспартата проводили независимо для четырех остатков (рис. 1). Проведенные вычисления показывают, что три остатка Asp151 в свободном ферменте депротонированы при нейтральных условиях среды – значения pK_a лежат в диапазоне 4,1–4,3, в то время как один остаток (обозначенный Asp2 на рис. 1) имеет более высокое значение pK_a – 6,7. Анализ положения петли-150 в субъединице с аномально высоким (6,7) значением pK_a Asp151 показал, что при моделировании в сильнокислой среде (pH 2) в этой субъединице, в отличие от остатков Asp151 в трех других субъединицах, происходит образование не наблюдаемой в кристаллографических структурах фермента карбоксил-карбоксилатной пары между Asp151 и Glu119. Можно предположить, что в этом случае имеет место переход к денатурированному состоянию, которое нельзя отнести к каталитически активной форме.

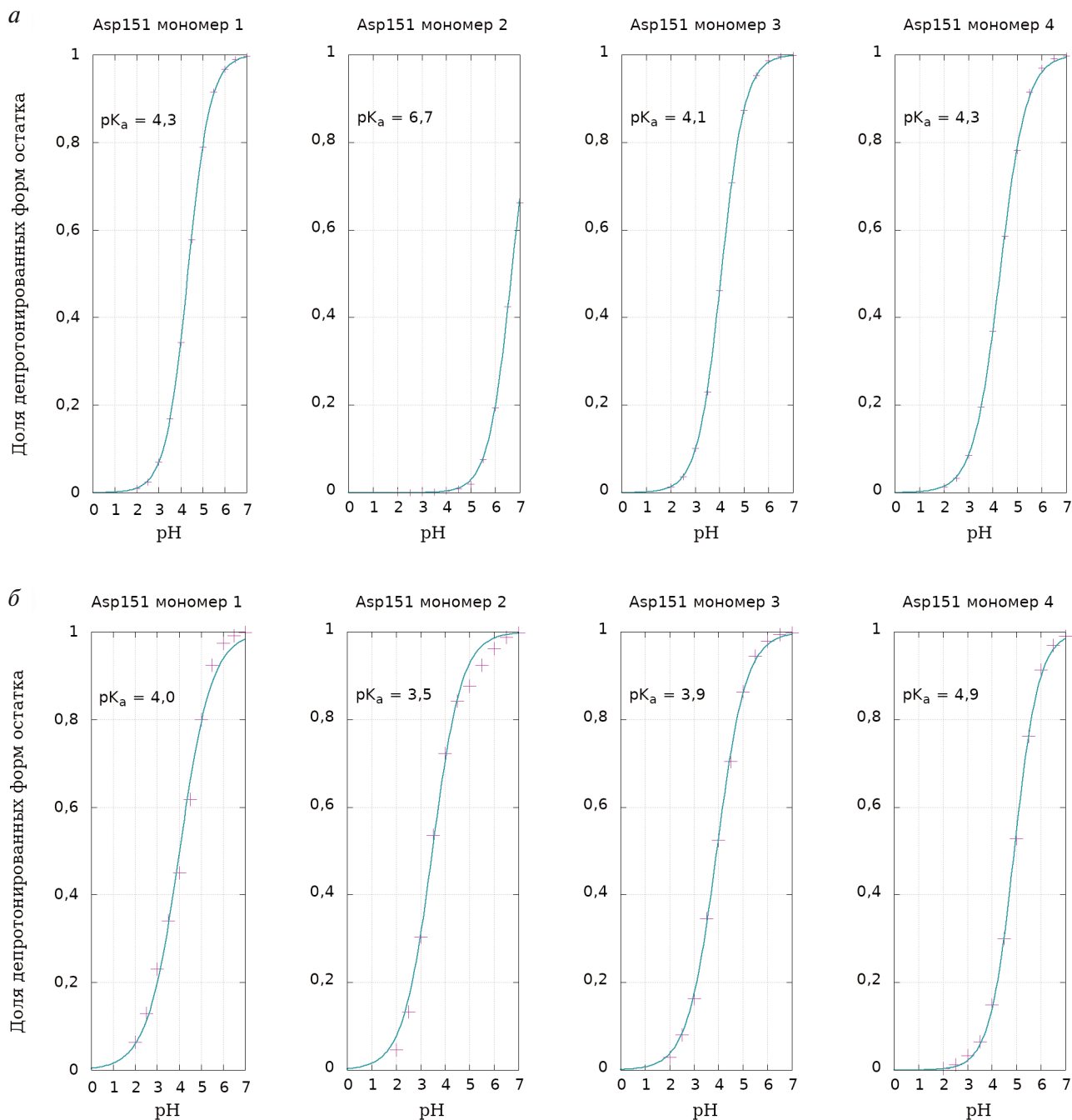


Рис. 1. Кривые титрования аминокислотных остатков Asp151 в четырех субъединицах гомотетрамера нейраминидазы вируса гриппа H5N1 с приведенными расчетными значениями pK_a (см. «Материалы и методы»): *a* – для свободной формы фермента; *b* – для комплекса фермента с олигосахаридным субстратом, связанным в активном центре. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

Нейраминидазы из разных источников отличаются строением активных центров и окружением ионизируемых остатков, различия обнаружены также в динамическом поведении петли-150, содержащей Asp151 [23], что может быть причиной различного влияния связывания

субстрата на pK_a остатка в разных ферментах этого семейства. При расчетах протонирования/депротонирования аспартата в фермент-субстратном комплексе, образованном нейраминидазой N1, было обнаружено, что значение pK_a Asp151 находится в пределах 3,5–4,9. Обна-

руженный интервал значений свидетельствует о наличии различных стабилизированных структурных топологий олигосахаридного субстрата в активном центре (см. подраздел «Конформационное состояние олигосахаридного субстрата при связывании с ферментом»). Наиболее распространённой конформацией субстрата соответствует значение pK_a 4,9. В то же время можно заключить, что в случае изучаемой нами нейраминидазы N1 при связывании субстрата не наблюдается столь существенного сдвига pK_a , как это было обнаружено для нейраминидазы N9 (до значений 8,0–9,0) [11]. Полученные при моделировании расчетные значения pK_a остатка аспартата в нейраминидазе N1, на первый взгляд, противоречат возможности осуществления эффективного катализа в нейтральных средах с участием этой группы для прямой передачи протона на уходящую группу субстрата. Однако подобное заключение не представляется столь категоричным, если рассмотреть другие возможные пути стабилизации уходящей группы в каталитическом механизме действия фермента. Так, при постоянном доступе молекул растворителя к карбоксильной группе остатка Asp151 возможен механизм переноса протонов Гротгуса, который уже наблюдали в ферментативных системах [24, 25]. Кроме того, депротонированная форма аспартата может стабилизировать молекулу воды в нейтральной форме или

в форме гидроксония вблизи кислорода уходящей группы и таким образом обеспечить необходимый перенос протона. Анализ функции распределения молекул воды вокруг атомов кислорода уходящей группы и карбоксильного углерода Asp151 в свободном ферменте и в фермент-субстратном комплексе (рис. 2, *a, б*), определенной на основе молекулярно-динамических траекторий при значениях pH 5,5; 6,0; 6,5 и 7,0, позволяет оценить возможность реализации такого механизма.

При анализе распределения расстояний от атомов кислорода карбоксильной группы до атома кислорода уходящей группы становится понятно, что молекулы воды имеют прямой доступ к разрываемой связи и могут быть не только звеном мостикового соединения между остатком Asp151 и уходящей группой, но и выступать в качестве донора протона. Включение иона гидроксония в такую цепочку передачи протона может быть обусловлено окружающими остатками фермента, а также возможностью оптимальной ориентации и стабилизации всей системы [26]. Чтобы оценить энергетические барьеры образования промежуточного гликозилфермента по альтернативному механизму, необходим конформационный анализ положений углеводного субстрата в активном центре нейраминидазы для получения стартовой структуры фермент-субстратного комплекса.

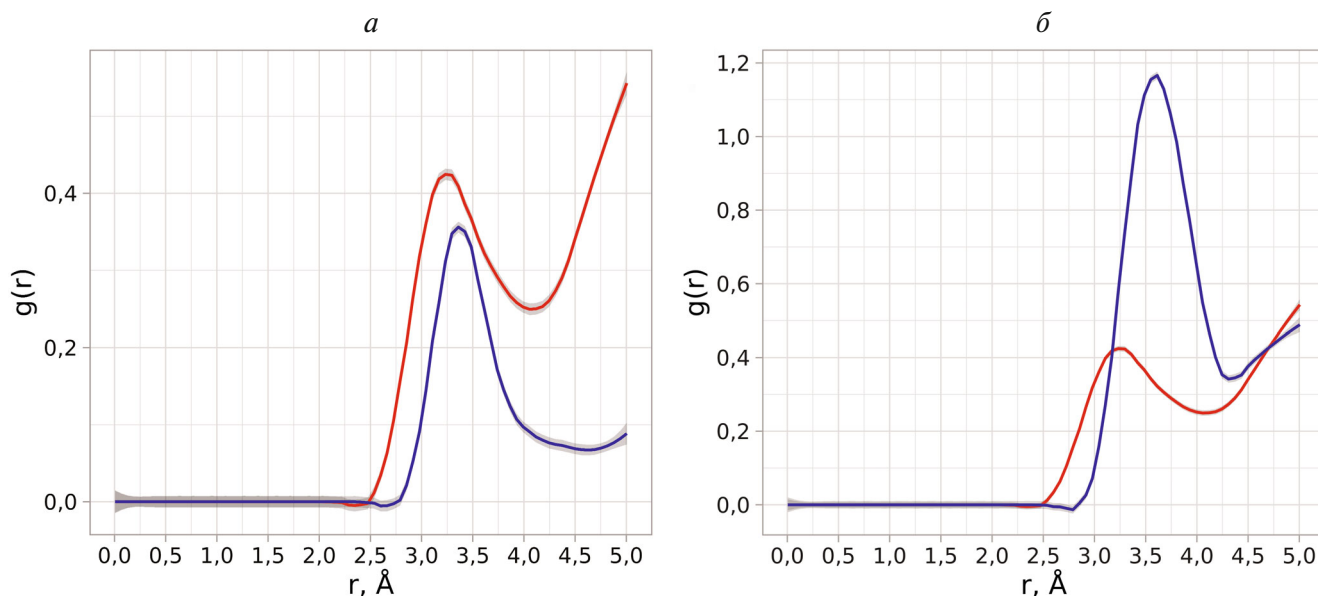


Рис. 2. *a* – Радиальная функция распределения молекул воды (красная линия) вокруг атома кислорода уходящей группы и функция распределения расстояний от атома кислорода уходящей группы до атомов кислорода карбоксильной группы Asp151 (синяя линия); *б* – радиальная функция распределения молекул воды вокруг карбоксильного углерода Asp151 в свободной (красная линия) и в связанной с олигосахаридным субстратом (синяя линия) формах фермента. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

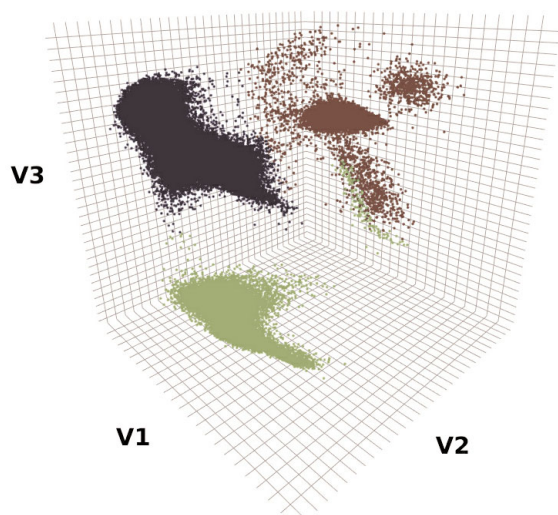


Рис. 3. Сэмплирование конформационного пространства олигосахаридного субстрата в активном центре нейраминидазы N1 с последующей кластеризацией. Для наглядности данные визуализированы относительно первых трех главных компонент при анализе восьми переменных двугранных углов, характеризующих конформацию олигосахаридов; принадлежность к одному кластеру обозначена цветом.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

Конформационное состояние олигосахаридного субстрата при связывании с ферментом. Конформационное пространство олигосахаридного субстрата, связанного в активном центре нейраминидазы N1, было определено при анализе траекторий молекулярной динамики, полученных в результате симуляций титрования Asp151 при различных значениях pH в интервале 5–7. Значения двугранных углов гликозидных связей в ходе симуляций были извлечены, преобразованы (как описано в экспериментальной части) и использованы для поиска кластеров стабилизированных структур – топологий (рис. 3).

Обнаруженные топологии олигосахаридов, а также соответствующие характеристические значения двугранных углов приведены в таблице. Аналогичным образом проведенный поиск дополнительных структурных кластеров методом ускоренной молекулярной динамики новых топологий не выявил. Для субстрата, связанного в активном центре фермента, характерно существование трех возможных топологий (таблица). Преобладающая топология 1 характеризуется значениями двугранных углов ϕ_1 – 84,29; ψ_1 – 98,90; ϕ_2 – 95,70 и ψ_2 – 105,71. Популяции топологии 2 и 3 представлены в активном центре на 8 и 14% соответственно, при этом топология 2 ориентирована вдоль активного центра идентично топологии 1, тогда как топология 3 свиде-

тельствует о существовании альтернативной полости связывания. Следует отметить, что сходную с топологией 1 структуру трисахаридов наблюдали при связывании с нейраминидазой N2 штамма H3N2 (рентгенографическая структура 4GZW [27]).

Формирование промежуточного гликозилфермента. Моделирование процесса образования гликозилфермента проводили с использованием метадинамики. Начальная структура фермент-субстратного комплекса была взята с характеристическими для топологии 1, преобладающей при связывании олигосахаридного субстрата в активном центре фермента (см. предыдущий раздел), двугранными углами и конформацией кольца остатка нейраминовой кислоты 5S_1 [28]. В качестве коллективных переменных, в фазовом пространстве которых происходит гидролиз субстрата и образование промежуточного продукта реакции гликозилфермента, были использованы: 1) параметр CV1, характеризующий разрыв гликозидной связи субстрата по остатку силановой кислоты и образование новой связи с Tyr406, а также представляющий разницу расстояний между $C1_{SIA}-O_{Tyr406}$ и $C1_{SIA}-O_{3LB}$; 2) параметр CV2, отражающий активацию нуклеофильного остатка Tyr406 переносом протона на Glu277; 3) параметр CV3, характеризующий переход протона на уходящую группу от одной из молекул воды или остатка Asp151 (рис. 4, а) и определяемый как минимальное расстояние между одним из протонов, принадлежащих молекулам воды, входящим в квантовую область (8 молекул), или протоном, принадлежащим остатку Asp151 – тем самым учитывается возможность наиболее быстрого и энергетически выгодного пути переноса протона как от молекул воды, так и от остатка Asp151.

Следует отметить, что в стартовой структуре предусматривали возможность протонирования остатка Asp151, что позволило при моделировании учитывать не только механизм передачи протона от иона гидроксония, координированного карбоксилатным анионом Asp151, но и теоретический вариант передачи протона уходя-

Характерные значения двугранных углов олигосахаридного субстрата в активном центре нейраминидазы N1

Двугранный угол					Соотношение
	ϕ_1	ψ_1	ϕ_2	ψ_2	
Кластер					
1	84,29	-110,90	-100,70	105,02	78%
2	74,89	-112,41	-86,49	-57,60	8%
3	-171,95	-129,39	-76,27	136,43	14%

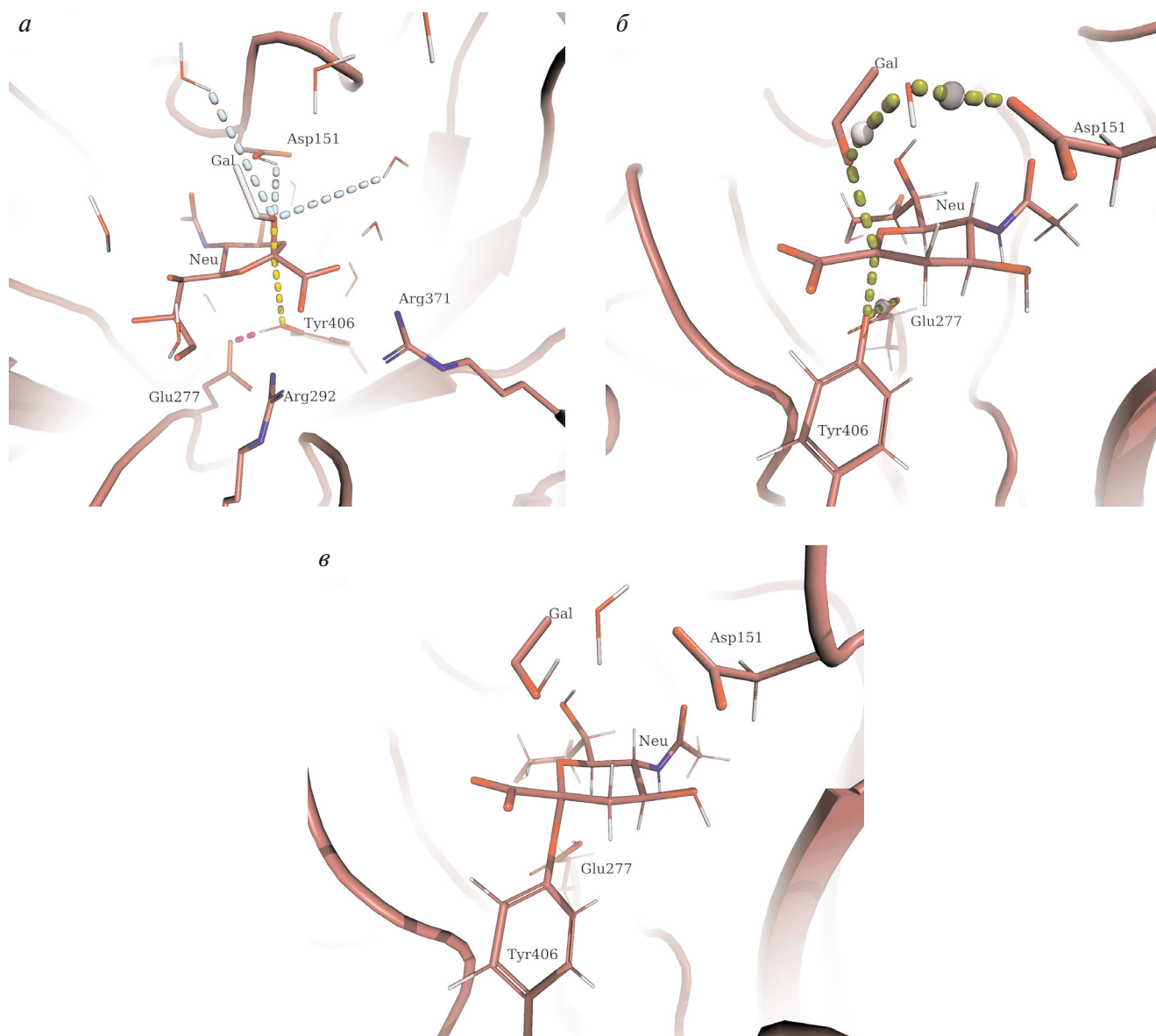


Рис. 4. Структуры основных стационарных состояний при образовании ковалентного промежуточного соединения – гликозилфермента в реакции, катализируемой нейраминидазой вируса гриппа H5N1. Gal обозначена уходящая группа, Neu – углеводный остаток сиаловой кислоты. *a* – Структура фермент-субстратного комплекса с обозначением цветным пунктиром основных составляющих коллективных переменных, включая путь переноса протона на Glu277 и активацию нуклеофильного остатка Tyr406 (розовый), для указания разрываемой и образуемой связей (желтый), и любой процесс переноса протона с окружающих молекул воды или Asp151 (голубой); *б* – структура переходного состояния системы; *в* – образование гликозилфермента.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

щей группе напрямую. Таким образом, выбранная квантовая область представляла одинаковую стартовую точку для двух возможных путей передачи протона на уходящую группу гидролизующего субстрата.

При помощи КМ/ММ с использованием трех выбранных коллективных переменных было проведено моделирование реакции фермен-

тативного гидролиза олигосахаридного субстрата и определена энергетическая поверхность этого процесса (рис. 5). По критериям порядка связи по Полингу процесс соответствовал диссоциативному $A_N D_N$ механизму с барьером порядка 14 ккал/моль (рис. 5, *a, б*). Остаток сиаловой кислоты претерпевал структурное изменение от 5S_1 конформации кольца в фермент-

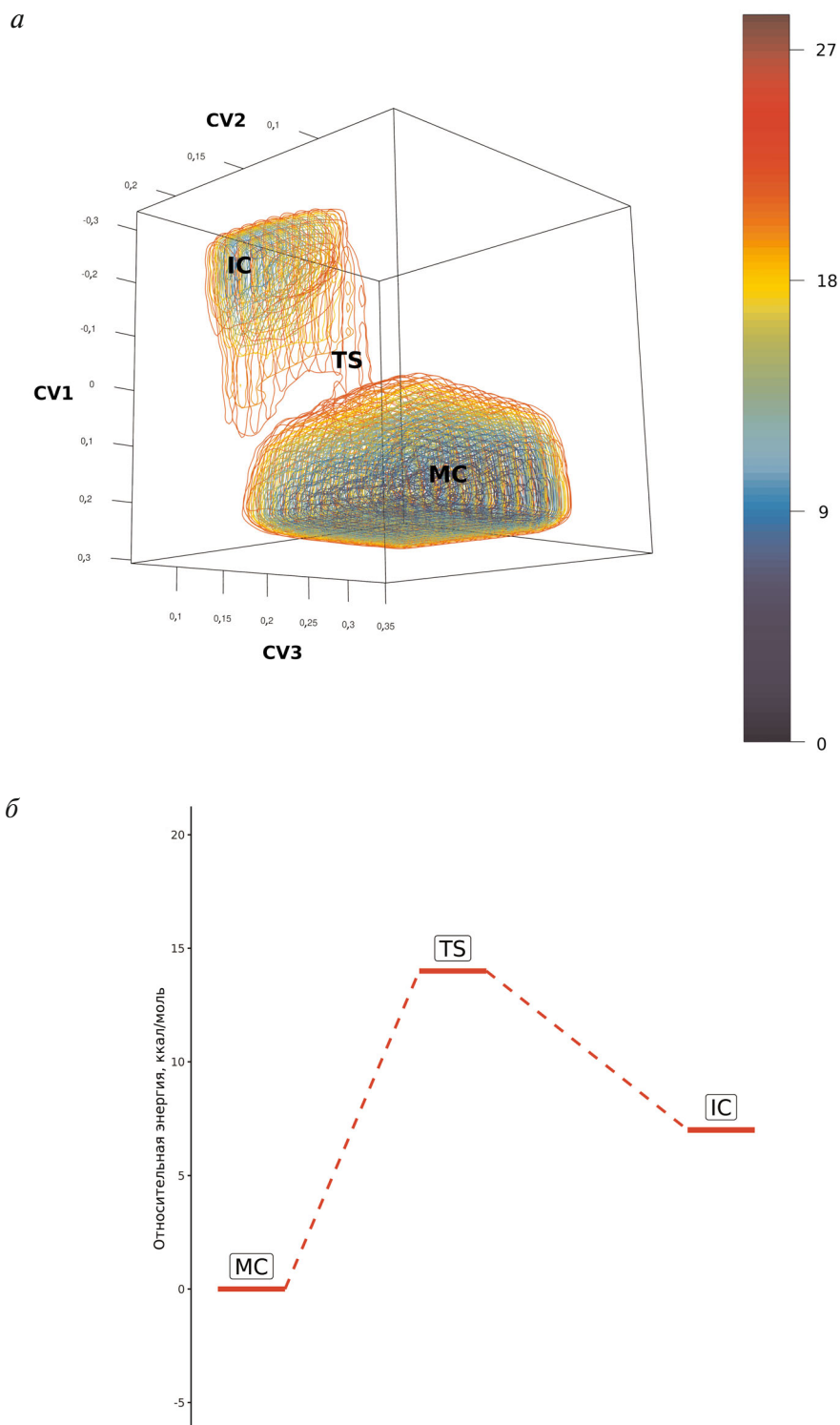


Рис. 5. *a*) Поверхность свободной энергии стадии образования промежуточного ковалентного соединения – гликозилфермента в реакции гидролиза олигосахаридного субстрата, катализируемого нейраминидазой вируса гриппа H5N1, построенная на основе коллективных переменных разрыва гликозидной связи субстрата по остатку сиаловой кислоты и образования новой с Tug406 (CV1), активации нуклеофильного остатка Tug406 (CV2) и передачи протона от одной из молекул воды или остатка Asp151 на уходящую группу субстрата (CV3). MC – комплекс фермента с субстратом, TS – переходное состояние перед образованием гликозилфермента, IC – промежуточный гликозилфермент. *б*) Упрощенная энергетическая диаграмма стадии образования промежуточного ковалентного соединения – гликозилфермента. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

субстратном комплексе (МС, рис. 4, а) до конформации $E_4-^3H_4$ в переходном состоянии (TS, рис. 4, б) и 1C_4 (IC, рис. 4, в) в промежуточном гликозилферменте, положение которого на энергетической диаграмме было выше исходного состояния на 7 ккал/моль (рис. 5, а, б). В ходе ферментативной реакции протон для нейтрализации уходящей группы переносился от ближайшей молекулы воды, образующей связующий мостик между гликозидной связью субстрата и остатком Asp151. Следует отметить, что остаток Asp151, как и молекула воды, может выполнять двойную роль. Когда карбоксильная группа Asp151 протонирована, молекула воды может выступать в качестве челнока и при передаче протона на уходящую группу субстрата одновременно забирает протон от Asp151. В случае, когда карбоксильная группа Asp151 депротонирована, она может координировать ион гидроксония, который служит донором протона для уходящей группы субстрата. Вероятность реализации того или иного пути зависит от целого ряда условий: кроме кислотности среды, важное значение имеет подвижность петли-150 и особенности структурной организации активного центра в мутантных формах фермента. Участие остатка Asp151 с протонированной карбоксильной группой в каталитическом механизме, по-видимому, менее выгодно, т.к. петля-150 ограничивает движение остатка и затрудняет формирование цепи прямого переноса протона: подобные состояния не были обнаружены при независимых запусках траекторий молекулярной динамики. Тем не менее такой механизм нельзя исключить при функционировании фермента в более кислых средах. В то же время установленный нами путь передачи протона от иона гидроксония, координированного отрицательно заряженной карбоксилатной группой Asp151, может быть более универсальным и функционировать в широком интервале рН, обуславливая двойной тропизм вируса и циркуляцию специфических штаммов H5N1, способных к прямой передаче от птиц к человеку, наблюдаемой в ходе последних вспышек заболеваний 1998–2015 годов.

Каталитический механизм действия нейраминидаз различных штаммов вируса гриппа, а

также способность ферментов функционировать в различных средах, представляют не только фундаментальный, но и существенный практический интерес. Важную роль в превращении гликанов, катализируемом нейраминидазами, имеет конформационное состояние олигосахаридного субстрата, а также стадии образования и последующего гидролиза промежуточного гликозилфермента. Проведенное молекулярное моделирование механизма действия нейраминидазы N1 позволило выявить сродство активного центра фермента к определенному конформеру субстрата и установить, какие последующие конформационные изменения имеют место в ходе ферментативного превращения. Был проведен анализ возможных путей образования промежуточного гликозилфермента в реакциях под действием нейраминидазы вируса гриппа H5N1 в средах разной кислотности, что имеет непосредственное отношение к адаптации и размножению вируса в дыхательных путях человека, а также передаче штаммов вируса гриппа от птиц человеку. Понимание особенностей функционирования нейраминидаз различных штаммов вируса гриппа в различных условиях, как одного из ключевых факторов вирулентности вируса, является важным этапом как при разработке методов профилактики, так и средств борьбы с гриппом, а также другими инфекциями, отличающимися подобным механизмом.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-00953).

Благодарности. Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова [29].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. URL: https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/
2. Welkers, M. R. A., Pawestri, H. A., Fonville, J. M., Sampurno, O. D., Pater, M., Holwerda, M., Han, A. X., Russell, C. A., Jeeninga, R. E., Setiawaty, V., de Jong, M. D., and Eggink, D. (2019) Genetic diversity and host adaptation of avian H5N1 influenza viruses during human infection, *Emerg. Microbes Infect.*, **8**, 262–271, doi: 10.1080/22221751.2019.1575700.
3. Mitnaul, L. J., Matrosovich, M. N., Castrucci, M. R., Tuzikov, A. B., Bovin, N. V., Kobasa, D., and Kawaoka, Y. (2000) Balanced hemagglutinin and neuraminidase activi-

- ties are critical for efficient replication of influenza A virus, *J. Virol.*, **74**, 6015-6020, doi: 10.1128/JVI.74.13.6015-6020.2000.
4. Russell, R. J., Haire, L. F., Stevens, D. J., Collins, P. J., Lin, Y. P., Blackburn, G. M., Hay, A. J., Gamblin, S. J., and Skehel, J. J. (2006) The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design, *Nature*, **443**, 45-49, doi: 10.1038/nature05114.
 5. Takahashi, T., Nidom, C. A., Quynh Le, M. T., Suzuki, T., and Kawaoka, Y. (2012) Amino acid determinants conferring stable sialidase activity at low pH for H5N1 influenza A virus neuraminidase, *FEBS Open Bio*, **2**, 261-266, doi: 10.1016/j.fob.2012.08.007.
 6. Suzuki, T., Takahashi, T., Saito, T., Guo, C.-T., Hidari, K. I.-P. J., Miyamoto, D., and Suzuki, Y. (2004) Evolutional analysis of human influenza A virus N2 neuraminidase genes based on the transition of the low-pH stability of sialidase activity1, *FEBS Lett.*, **557**, 228-232, doi: 10.1016/S0014-5793(03)01503-5.
 7. Takahashi, T., Kurebayashi, Y., Ikeya, K., Mizuno, T., Fukushima, K., Kawamoto, H., Kawaoka, Y., Suzuki, Y., and Suzuki, T. (2010) The low-pH stability discovered in neuraminidase of 1918 pandemic influenza A virus enhances virus replication, *PLoS One*, **5**, doi: 10.1371/journal.pone.0015556.
 8. Fischer, H., and Widdicombe, J. H. (2006) Mechanisms of acid and base secretion by the airway epithelium, *J. Membr. Biol.*, **211**, 139-150, doi: 10.1007/s00232-006-0861-0.
 9. Koshland, D. E. (1953) Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions, *Biological Reviews*, **28**, 416-436.
 10. Guce, A. I., Clark, N. E., Salgado, E. N., Ivanen, D. R., Kulminkaya, A. A., Brumer, H., and Garman, S. C. (2010) Catalytic mechanism of human α -galactosidase, *J. Biol. Chem.*, **285**, 3625-3632, doi: 10.1074/jbc.M109.060145.
 11. Yu, H., and Griffiths, T. M. (2014) p K a cycling of the general acid/base in glycoside hydrolase families 33 and 34, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **16**, 5785-5792, doi: 10.1039/C4CP00351A.
 12. Woods, R. J. (2008) Biomolecule Builder, GLYCAM Web, Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia.
 13. Case, D. A., Babin, V., Berryman, J., Betz, R. M., Cai, Q., et al. (2014) Amber 14, University of California, San Francisco.
 14. Mahoney, M. W., and Jorgensen, W. L. (2000) A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions, *J. Chem. Phys.*, **112**, 8910-8922, doi: 10.1063/1.481505.
 15. Paterlini, M. G., and Ferguson, D. M. (1998) Constant temperature simulations using the Langevin equation with velocity Verlet integration, *Chem. Phys.*, **236**, 243-252, doi: 10.1016/S0301-0104(98)00214-6.
 16. Tribello, G. A., Bonomi, M., Branduardi, D., Camilloni, C., and Bussi, G. (2014) PLUMED 2: new feathers for an old bird, *Comp. Phys. Commun.*, **185**, 604-613, doi: 10.1016/j.cpc.2013.09.018.
 17. Raiteri, P., Laio, A., Gervasio, F. L., Micheletti, C., and Parrinello, M. (2006) Efficient reconstruction of complex free energy landscapes by multiple walkers metadynamics, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 3533-3539, doi: 10.1021/jp054359r.
 18. Pierdominici-Sottile, G., Horenstein, N. A., and Roitberg, A. E. (2011) Free energy study of the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. From the michaelis complex to the covalent intermediate, *Biochemistry*, **50**, 10150-10158, doi: 10.1021/bi2009618.
 19. Bueren-Calabuig, J. A., Pierdominici-Sottile, G., and Roitberg, A. E. (2014) Unraveling the differences of the hydrolytic activity of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and *Trypanosoma rangeli* sialidase: a quantum mechanics-molecular mechanics modeling study, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 5807-5816, doi: 10.1021/jp412294r.
 20. Harris, R. C., and Shen, J. (2019) GPU-accelerated implementation of continuous constant pH molecular dynamics in Amber: pK_a predictions with single-pH simulations, *J. Chem. Inf. Model.*, **59**, 4821-4832, doi: 10.1021/acs.jcim.9b00754.
 21. Costa, S. I. R., Torezzan, C., Campello, A., and Vaishampayan, V. A. (2013) *Flat tori, lattices and spherical codes*, 1-8 in 2013 Information Theory and Applications Workshop (ITA), doi: 10.1109/ITA.2013.6503002.
 22. Straub, J., Campbell, T., How, J. P., and Fisher, J. W. (2015) *Small-variance nonparametric clustering on the hypersphere*, The IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), 334-342.
 23. Amaro, R. E., Minh, D. D. L., Cheng, L. S., Lindstrom, W. M., Olson, A. J., Lin, J.-H., Li, W. W., and McCammon, J. A. (2007) Remarkable loop flexibility in avian influenza N1 and its implications for antiviral drug design, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 7764-7765, doi: 10.1021/ja0723535.
 24. Riccardi, D., König, P., Prat-Resina, X., Yu, H., Elstner, M., Frauenheim, T., and Cui, Q. (2006) "Proton Holes" in long-range proton transfer reactions in solution and enzymes: a theoretical analysis, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 16302-16311, doi: 10.1021/ja065451j.
 25. Parke, C. L., Wojcik, E. J., Kim, S., and Worthylake, D. K. (2010) ATP Hydrolysis in Eg5 Kinesin Involves a Catalytic Two-water Mechanism, *J. Biol. Chem.*, **285**, 5859-5867, doi: 10.1074/jbc.M109.071233.
 26. Mohammed, O. F., Pines, D., Dreyer, J., Pines, E., and Nibbering, E. T. (2005). Sequential proton transfer through water bridges in acid-base reactions, *Science*, **310**, 83-86.
 27. Zhu, X., McBride, R., Nycholat, C. M., Yu, W., Paulson, J. C., and Wilson, I. A. (2012) Influenza virus neuraminidases with reduced enzymatic activity that avidly bind sialic acid receptors, *J. Virol.*, **86**, 13371-13383, doi: 10.1128/JVI.01426-12.
 28. Kirilin, E. M., and Švedas, V. K. (2018) Study of the conformational variety of the oligosaccharide substrates of neuraminidases from pathogens using molecular modeling, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **73**, 39-45, doi: 10.3103/S0027131418020050.
 29. Sadovnichy, V., Tikhonravov, A., Voevodin, V., and Opanasenko, V. (2017) "Lomonosov": supercomputing at Moscow State University, Contemporary High Performance Computing, doi: 10.1201/9781351104005-11.

**THE PATHWAY ANALYSIS AT THE FORMATION
OF GLYCOSYL-ENZYME INTERMEDIATE IN THE CATALYTIC
MECHANISM OF THE INFLUENZA A VIRUS NEURAMINIDASE
USING METHODS OF MOLECULAR MODELING***

E. M. Kirilin^{1} and V. K. Švedas^{1,2**}**

¹ *Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physicochemical Biology,
119991 Moscow, Russia; E-mail: kirilin@belozersky.msu.ru; vyta@belozersky.msu.ru*

² *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia*

Received February 3, 2020

Revised March 2, 2020

Accepted March 2, 2020

Comprehensive usage of classical molecular dynamics, constant-pH molecular dynamics simulations, metadynamics as well as combined quantum mechanical and molecular mechanical approach has revealed an alternative pathway at the formation of glycosyl-enzyme intermediate in the conversion of oligosaccharide substrates catalyzed by the H5N1 influenza neuraminidase. The Asp151 residue, located on a mobile loop, plays a key role in the mechanism of the proton transfer from the water molecule to the leaving group of the substrate during the formation of the covalent intermediate glycosyl-enzyme compound. Since the growth and replication of influenza virus in birds takes place under the conditions of the digestive system at low pH values, and in humans under conditions close to neutral, the implementation of alternative pathways for the reaction at different acidities of the medium can mediate the double tropism of the virus and the circulation of specific strains of the H5N1 virus, prone to transmission from birds to humans.

Keywords: influenza, neuraminidase, glycosyl-enzyme