

УДК 578.282;57.012.7; 577.359; 616.921.5

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ДИНАМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ УЧАСТКА СВЯЗЫВАНИЯ ИНГИБИТОРОВ КОНФОРМАЦИОННОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА H3N2 И H7N9*

© 2020 Д.Д. Подшивалов^{1**}, Е.М. Кирилин^{1,2}, С.И. Коннов¹, В.К. Швядас^{1,2**}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия; электронная почта: david.podshivalov@belozersky.msu.ru, vytas@belozersky.msu.ru

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 04.02.2020

После доработки 02.03.2020

Принята к публикации 02.03.2020

Для исследования структурной организации и динамических характеристик участка связывания ингибиторов конформационной перестройки белка разработаны компьютерные модели гемагглютинаина вирусов гриппа H3N2 и H7N9. Использование метадинамики позволило составить карту свободной энергии данных участков и установить объемы их наиболее энергетически выгодных состояний. При молекулярном моделировании взаимодействия умифеновира (арбидола) с гемагглютинином показано, что для связывания лиганда необходимо увеличение объема и деформация энергетически наиболее выгодного состояния участка связывания ингибиторов конформационной перестройки. Идентифицированы аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании ингибитора и определяющие эффективность взаимодействия, а также динамическое поведение участка связывания ингибиторов конформационной перестройки гемагглютинаина. Выявленные свойства и особенности структурной организации участка связывания ингибиторов конформационной перестройки гемагглютинаина вируса гриппа необходимо учитывать при поиске новых противовирусных препаратов, способных модулировать его функциональные свойства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гемагглютинин, вирус гриппа, молекулярная динамика, метадинамика.

DOI: 10.31857/S0320972520040107

Гемагглютинин (HA) — важнейший гликопротеин на поверхности вируса гриппа. Он играет ключевую роль в процессе заражения, так как распознает рецепторы на поверхности мембраны клетки-хозяина, при связывании претерпевает существенные структурные изменения и обеспечивает слияние вирусной и клеточной мембран, а также проникновение вирусных рибонуклеопротеидов в здоровую клетку [1]. Подавление процесса заражения на ранних стадиях — важная задача в борьбе с вирусом гриппа, поэтому гемагглютинин является привлекательной мишенью для поиска противовирусных препаратов. Первичной мишенью действия терапевтических средств является участок связывания олигосахаридных рецепторов, располо-

женный в головной области гемагглютинаина, ориентированной от мембраны вируса в сторону окружающей среды, что делает его доступным для иммунной системы. Вакцины против гриппа часто направлены именно на этот участок [2]. К сожалению, его расположение приводит к тому, что этот участок приобрел крайне высокую вариабельность в результате мутаций [3–6]. В связи с этим необходим поиск противовирусных препаратов, направленных на другие, более консервативные участки связывания в структуре гемагглютинаина. В последнее время особый интерес исследователей вызывает участок, расположенный в высококонсервативной стволовой области [7], вблизи пептида слияния, ответственного за структурную перестройку белка. С помощью методов рентгеноструктурного анализа показана способность данного участка связывать такие соединения, как третиичный бутилгидрохинон [7], *N*-циклогексилтаурин [8] и умифеновир [9]. Подобные соединения, связываясь на этом участке в структуре HA, по мнению авторов, способны индуцировать конфор-

Принятые сокращения: HA — гемагглютинин; CV — коллективная переменная.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-031, 01.04.2020.

** Адресат для корреспонденции.

мационные изменения прилежащих остатков, образуя сеть взаимодействий, стабилизирующих всю субъединицу НА и препятствующих структурным перестройкам белка. Найденный участок связывания ингибиторов конформационной перестройки НА может быть ранее неизвестной мишенью действия противовирусных препаратов и альтернативой для поиска новых противогриппозных средств.

Широко применяемым методом компьютерного поиска потенциальных ингибиторов белков является докинг. Для эффективного использования этого метода необходимо создать библиотеку подходящих низкомолекулярных претендентов и определить с областью их связывания. Однако в случаях, когда область связывания не является хорошо изученным участком в структуре белка, целесообразно разработать адекватную компьютерную модель молекулярной мишени, причем от качества созданной модели в значительной степени зависит успех последующего поиска новых ингибиторов. Наряду с организацией статической трехмерной структуры необходимо также исследовать динамические характеристики малоизученного участка. Как было показано на примере нейраминидазы – другого белка вируса гриппа, участки связывания лигандов могут иметь несколько возможных конформаций, их объем может также зависеть от штамма вируса [10]. Исследование динамического поведения участка связывания и поиск наиболее энергетически выгодных состояний являются ключевыми шагами молекулярного моделирования, предшествующими компьютерному поиску новых соединений. Такой подход в случае участка связывания ингибиторов конформационной перестройки гемагглютинаина является тем более актуальным, поскольку этот участок располагается в области, наиболее подверженной структурным изменениям при слиянии вируса со здоровыми клетками в организме хозяина, и при поиске комплементарных ингибиторов необходимо учитывать эту особенность.

В данной работе для исследования структурной организации и функциональных особенностей участка связывания ингибиторов конформационной перестройки белка были созданы компьютерные модели гемагглютинаина вирусов гриппа H3N2 и H7N9. Методы молекулярного моделирования были использованы для изучения динамических характеристик участков связывания ингибиторов конформационной перестройки в гемагглютинаинах вирусов гриппа H3N2 и H7N9, выявления аминокислотных остатков, участвующих в этом процессе, и определения наиболее энергетически выгодных состо-

яний участков, а также определения влияния их динамических свойств на эффективность взаимодействия с предполагаемыми ингибиторами на примере умифеновира. Полученные знания могут быть полезны для понимания механизма действия известных препаратов или использования при поиске новых противовирусных препаратов, способных модулировать функциональные свойства гемагглютинаина вируса гриппа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молекулярная динамика. При исследовании участка связывания умифеновира использовали структуру гемагглютинаина H3N2 (PDB ID 5t6n) и H7N9 (PDB ID 5t6s). Для атомов белка использовали силовое поле Amber ff14SB [11]. Каждый белок был помещен в ячейку, представленную прямоугольным параллелепипедом с гранями $100 \times 100 \times 163$ Å. Минимальное расстояние между белком и границей ячейки составляло 12 Å, ограничение на радиус действия невалентных взаимодействий составляло 10 Å. Расчет дальнедействующих электростатических взаимодействий проводили с использованием PME-алгоритма для периодических граничных условий; шаг сетки составлял 1 Å. В систему добавляли молекулы воды типа TIP3P и ионы Na^+ Cl^- в концентрации 0,1 М для создания ионной силы раствора и нейтрализации заряда. Стартовые модели оптимизировали в ходе 5000 циклов минимизации энергии. На подвижность атомов белков накладывали ограничения, после чего систему постепенно нагревали от 0 до 300 К при постоянном объеме. На следующем шаге при постоянной температуре устанавливали давление в 1 атм. Итоговый запуск молекулярной динамики НА при постоянном объеме и температуре системы проводили в программе pmemd.cuda программного пакета Amber14 [12]. Длительность полученных траекторий составляла 100 нс, из траекторий выделяли по 5000 кадров.

Метадинамика. Для того чтобы охарактеризовать энергетическое состояние участков связывания в гемагглютинаинах H3N2 и H7N9 при изменении их объема применяли метод метадинамики [13], позволяющий проводить ускоренное накопление статистики редких событий, контролируя при этом различные параметры системы с использованием т.н. коллективных переменных (CV). Ускоренное накопление статистики (или сэмплирование) происходит за счет постепенного добавления к общему потенциалу системы дополнительного набора заданных гауссовых потенциалов, зависящего от коллективных переменных. При этом коллективные

переменные могут быть выбраны в очень широком диапазоне от простых расстояний между атомами, двугранных или торсионных углов, до сложных коллективных переменных, которые могут являться, например, координационными числами между группами атомов. По результатам такого моделирования можно восстановить поверхность свободной энергии в зависимости от CV, определив, таким образом, энергетические характеристики исследуемого процесса.

При выборе коллективных переменных руководствовались тремя общепринятыми принципами: они должны определять начальное, промежуточное и конечное состояния исследуемого процесса, являться медленными для данной системы, их количество должно быть минимально возможным, так как введение любой дополнительной переменной существенно замедляет расчеты, а также усложняет анализ результатов. Для исследования участка в HA H3N2 в качестве CV был выбран объем участка связывания умифеновира, заданный с помощью функции CAVITY программы для моделирования метадинамики Plumed 2.4 [14]. Данная функция позволяет задавать объем, определяемый расположением в пространстве четырех атомов белка. От первого атома ко второму строится вектор \mathbf{r}_1 . Затем из первого атома строится вектор \mathbf{r}_2 , пер-

пендикулярный плоскости, содержащей первый, второй и третий атомы, а также вектор \mathbf{r}_3 , ортогональный векторам \mathbf{r}_1 и \mathbf{r}_2 . Первый атом и проекции четвертого атома на плоскости, образованные парами созданных векторов, определяют конечный прямоугольный параллелепипед, в котором рассчитывается значение какого-либо параметра, в данном случае количество молекул воды. В качестве опорных атомов были выбраны C α -атомы прилежащих к участку связывания аминокислотных остатков Ala304 и Leu316 цепи A, Trp92 цепи B и Lys310 C; объем прямоугольного параллелепипеда рассчитывали за вычетом объема попадающего в него фрагмента белка (рис. 1, а). По созданной CV накладывали дополнительные гауссовы потенциалы с высотой 4 кДж/моль и шириной 0,1.

В отличие от HA H3N2 в HA H7N9 различают закрытую и открытую форму исследуемого участка, поэтому для получения более полной картины изменения свободной энергии при моделировании динамического поведения участка была введена дополнительная коллективная переменная. Так как открытая и закрытая конформации определяются, главным образом, положением Arg54 цепи B, то в качестве CV была использована разница в расстояниях d1 и d2, где d1 – расстояние между атомом углерода гуани-

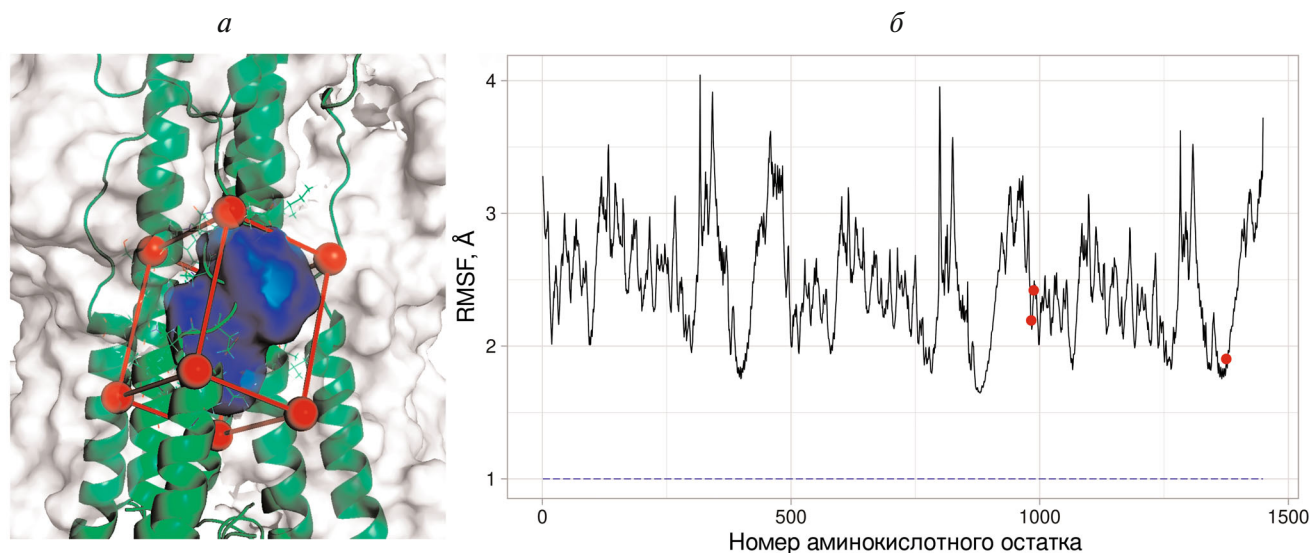


Рис. 1. а – Область связывания ингибиторов конформационной перестройки на поверхности гемагглютинина H3N2, выбранная для исследования методом метадинамики: красным цветом показана внешняя граница области, зеленым цветом – элементы вторичной структуры белка, а также ряд аминокислотных остатков, синим выделена область, объем которой меняется и измеряется в ходе эксперимента; б – график RMSF для гемагглютинина штамма H7N9. По форме графика можно различить три субъединицы белка. Красными точками отмечены аминокислотные остатки Glu97 цепи F, а также Asn27 и Arg32 цепи E, которые были выбраны для создания дополнительной коллективной переменной. Они обладают низким значением RMSF и расположены вблизи исследуемой области. Синей пунктирной линией показано значение RMSF (~0,96 Å) для центра масс тяжелых атомов этих остатков.

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

диновой группы Arg54 и центром масс трех стабильных остатков Glu97 цепи F, а также Asn27 и Arg32 цепи E (рис. 1, б), а d_2 – расстояние между атомом углерода гуанидиновой группы того же аргинина и атомом углерода карбоксильной группы остатка Glu103 цепи D. Такой выбор CV обусловлен необходимостью измерять энергию смещения остатка Arg54, не вводя при этом дополнительных искусственных ограничений на подвижность остальных остатков. Высота добавочных гауссовых потенциалов составляла 4 кДж/моль, ширина равнялась 0,1 и 0,2 для объема участка и расстояния соответственно.

Докинг. Кадры молекулярной динамики НА H3N2 были выровнены на стартовую структуру, а затем экспортированы в отдельные pdb-файлы. С помощью PMV [15, 16] были подготовлены pdbqt-файлы НА и одного из ингибиторов структурной перестройки – умифеновира. Для полученных структур был проведен докинг с помощью SMINA, использующей для докинга программу Vina [17]. SMINA запускали с параметром exhaustiveness, равным 20, а центром области для докинга была выбрана точка внутри исследуемого участка связывания лиганда. Дальнейший анализ проводили для 10 результатов докинга, характеризуемых наименьшей величиной оценочной функции. Для этих структур, а также для структур, полученных методом рентгеноструктурного анализа, была составлена таблица попарных RMSD. Итоговые данные были кластеризованы методом DBSCAN [18]. Значение minPts было выбрано равным 4, значение ϵ увеличивали до тех пор, пока кристаллографическая конформация умифеновира не оказывалась в одном из формирующихся кластеров из множества выбросов. Затем проводили оценку значения *silhouette* для ϵ , начиная с найденного и заканчивая таким ϵ , при котором *silhouette* был максимальным. Визуализацию полученных кластеров методом главных компонент проводили в Rstudio с помощью функции fviz_cluster. Такую же процедуру применяли и для траекторий метадинамики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В водном растворе структура белка подвержена естественным флуктуациям, что относится и к объему участка ингибиторов конформационной перестройки НА из-за движения образующих его остатков. Мы предлагаем определить объем участка связывания как количество вмещаемых молекул воды, что позволяет его охарактеризовать, не прибегая при этом к сложным алгоритмическим процедурам, как это делается

в различных программах [19]. Такой подход представляется перспективным при моделировании конформационных состояний, а также энергетических характеристик участка с использованием дополнительных внешних воздействий, например, в метадинимике [13], так как распределение сил происходит равномерно на все молекулы воды в исследуемом объеме, а не на отдельные атомы белка, что может приводить к нарушению его структуры и сэмплингованию высокоэнергетических незначимых конформаций. Количество вмещаемых молекул воды в качестве коллективной переменной было выбрано для изучения участка связывания ингибиторов структурной перестройки в гемагглютинах H3N2 и H7N9. Отличительной особенностью участка структурной перестройки НА H7N9 по сравнению с НА H3N2 является показанное методами рентгеноструктурного анализа наличие открытой и закрытой форм исследуемого участка, определяемое конформацией аминокислотного остатка Arg54 цепи B [9]. Поэтому исследование структурной организации и динамического поведения участка в НА H7N9 при помощи метадинамики проводили с использованием дополнительной коллективной переменной, характеризующей положение Arg54 цепи B.

Исследование динамических свойств участка связывания ингибиторов структурной перестройки НА H3N2. Поверхность свободной энергии участка связывания ингибиторов конформационной перестройки НА H3N2 была определена при интегрировании всех добавленных к системе в ходе метадинамики гауссовых потенциалов относительно выбранной коллективной переменной количества молекул воды (рис. 2). Видно, что на графике присутствует один энергетический минимум участка связывания, который соответствует объему, вмещающему от 23 до 34 молекул воды, при этом для выхода за пределы этого интервала необходимы большие (> 4 ккал/м) затраты энергии. Важно понять, какие аминокислотные остатки формируют участок, определяют его динамическое поведение и специфические взаимодействия с ингибиторами.

Для получения этой информации из полной траектории динамики были выделены кадры, в которых объем исследуемого участка соответствовал наиболее выгодным состояниям. С помощью функционала программы VMD [20] на основе выделенных кадров была построена усредненная структура гемагглютина H3N2, соответствующая наиболее энергетически выгодному состоянию участка связывания, и по всей траектории динамики для аминокислотных остатков в радиусе 8 Å от центра участка были рас-

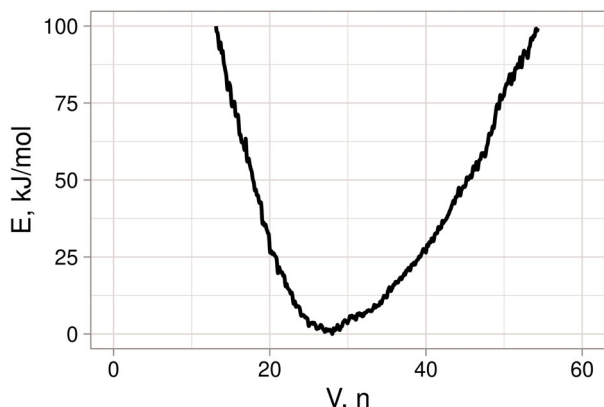


Рис. 2. Поверхность свободной энергии участка связывания ингибиторов конформационной перестройки гемагглютинаина H3N2 от объема (объем участка связывания указан в количестве вмещаемых молекул воды), определенная при моделировании с использованием метадинамики.

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

считаны отклонения от усредненной структуры. Карта зависимости значений RMSD выбранных остатков от объема участка представлена на рис. 3.

Значение RMSD остатков цепи A Phe294, цепи B Lys51, Glu57, Asn95, Ala96, Leu99, Glu103, цепи C Lys27, Thr28, Ile29, Asp32, Val309, Lys310, Gln311, Leu314 и цепи D Ile89, Asp90, Leu91, Trp92, Ser93, Tyr94, Asn95, Ala96, Glu97, Leu98 оставалось малым при оптимальном объеме участка связывания (т.е. в наиболее энергетически выгодном состоянии участка положение таких остатков стабильно) и сильно возрастало за его пределы. Это говорит о том, что количество молекул воды в участке связывания зависит именно от этих остатков. Для остальных остатков этот параметр не имеет ярко выраженных минимумов в зависимости от объема, следовательно, они не влияют на количество молекул воды в участке. RMSD остатков цепи B Arg54, Asn60, Glu103 и остатка цепи C Lys310 ос-

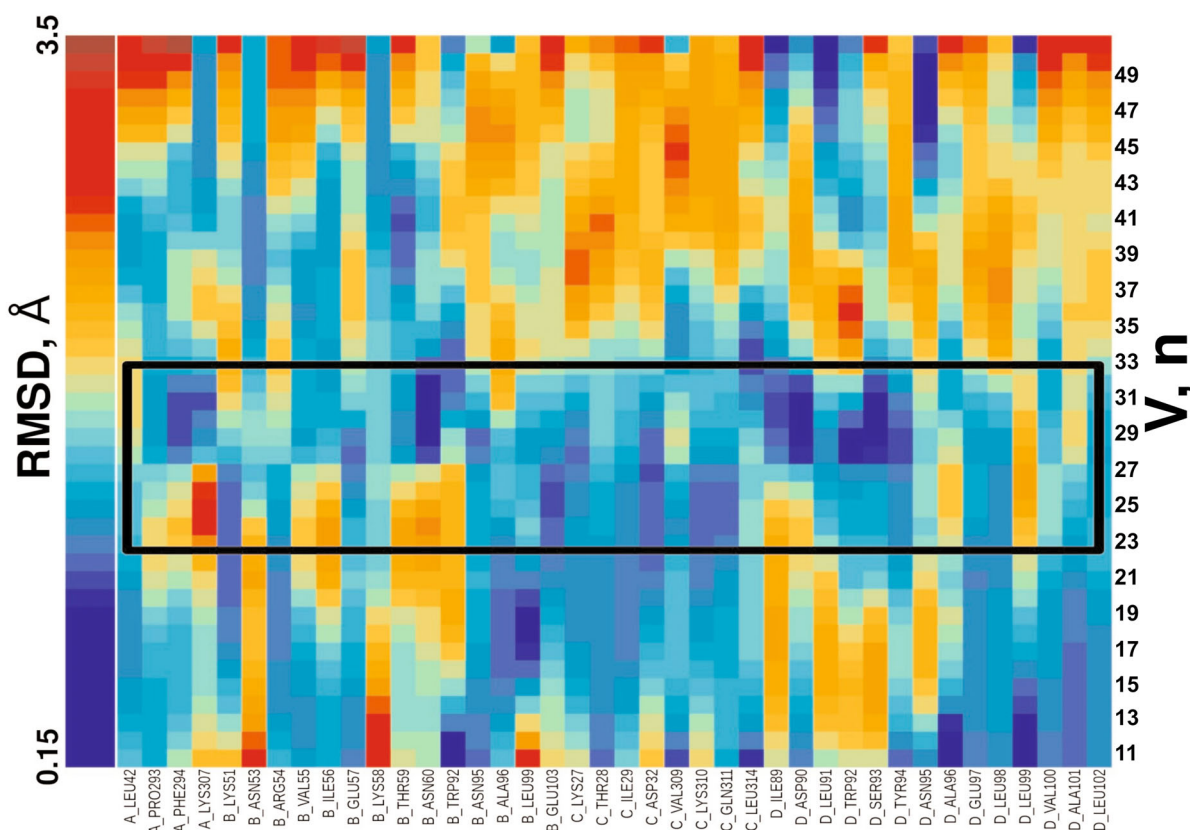


Рис. 3. Карта зависимости RMSD аминокислотных остатков, формирующих участок связывания в гемагглютинине H3N2, от его объема. Черной рамкой выделена область наиболее энергетически выгодных состояний участка. Синий цвет ячейки соответствует самому низкому значению, красный – самому высокому значению RMSD аминокислотного остатка при данном состоянии участка. График позволяет определить остатки, оказывающие наиболее сильное влияние на объем участка связывания – их RMSD остается низким для наиболее энергетически выгодных состояний участка (внутри черной рамки) и растет при дестабилизации участка (увеличении или уменьшении объема за пределы оптимального), тогда как RMSD остальных аминокислотных остатков изменяется вне зависимости от объема участка.

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

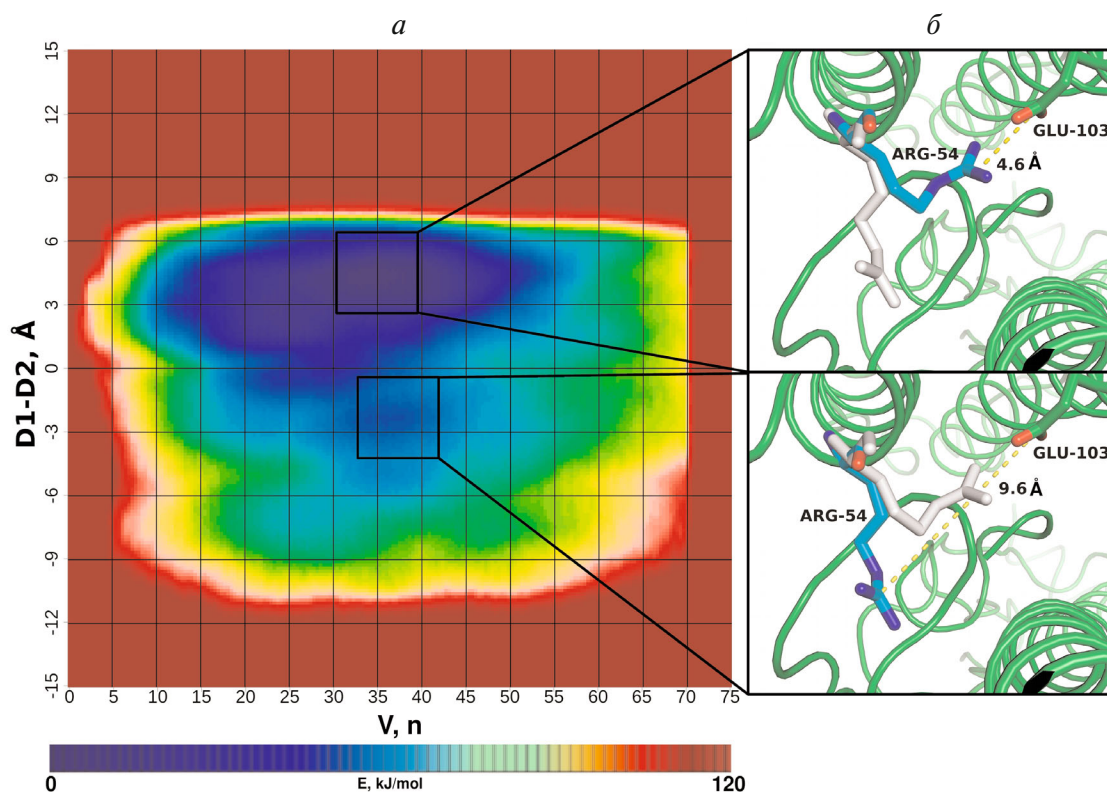


Рис. 4. Динамические характеристики участка связывания ингибиторов конформационной перестройки HA H7N9 при различных энергетических состояниях. *a* – Поверхность свободной энергии (значения представлены цветом по указанной шкале) при изменении объема участка, представленного как количество вмещаемых молекул воды. По вертикальной оси отложена разница в расстояниях $d1$ и $d2$, где $d1$ – расстояние между атомом углерода гуанидиновой группы Arg54 и центром масс трех стабильных остатков Glu97 цепи F и Asn27, Arg32 цепи E (не представлены на рисунке), а $d2$ – расстояние между атомом углерода гуанидиновой группы того же аргинина и атомом углерода карбоксильной группы остатка Glu103 цепи D (см. «Материалы и методы»); *б* – положение ключевого аминокислотного остатка Arg54 при закрытом конформационном состоянии участка (верхняя картинка) и изменение положения при переходе из закрытого состояния в открытое (нижняя картинка), зеленым цветом показаны элементы вторичной структуры HA, желтым штрихом – расстояние между атомами углерода гуанидиновой и карбоксильной групп Arg54 и Glu103. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

таются наиболее стабильными в своих положениях при флуктуациях объема участка и представляют собой особый интерес в качестве точек взаимодействия с потенциальными ингибиторами. Отдельного внимания заслуживают три остатка цепи D Ile89, Leu91 и Asn95: значение их RMSD быстро растет с увеличением объема, а затем быстро падает. Это свидетельствует о сложной зависимости объема участка связывания от конформационной подвижности и релаксационных перестроек этих остатков.

Исследование динамических свойств участка связывания ингибиторов структурной перестройки HA H7N9. Поверхность свободной энергии участка связывания ингибиторов конформационной перестройки HA H7N9 (рис. 4, *a*) была определена путем интегрирования всех добавленных к системе в ходе метадинамики гауссовых потенциалов относительно двух выбранных

коллективных переменных: 1) количества молекул воды в участке структурной перестройки и 2) положения остатка Arg54. Анализ поверхности позволяет определить различие между открытой и закрытой формами структуры участка связывания ингибиторов конформационной перестройки HA H7N9 по энергии и значению объема: оптимальному состоянию участка соответствует его закрытая конформация, которую можно характеризовать объемом 30–39 вмещаемых молекул воды, тогда как энергетически менее выгодная открытая конформация выше по энергии на 8 ккал/м и характеризуется увеличением объема участка связывания до 43 молекул воды, а также изменением положения остатка цепи V Arg54 (рис. 4, *б*).

Особенности связывания HA H3N2 и H7N9 с умифеновиром. Широкий набор конформаций белков, получаемый при использовании мета-

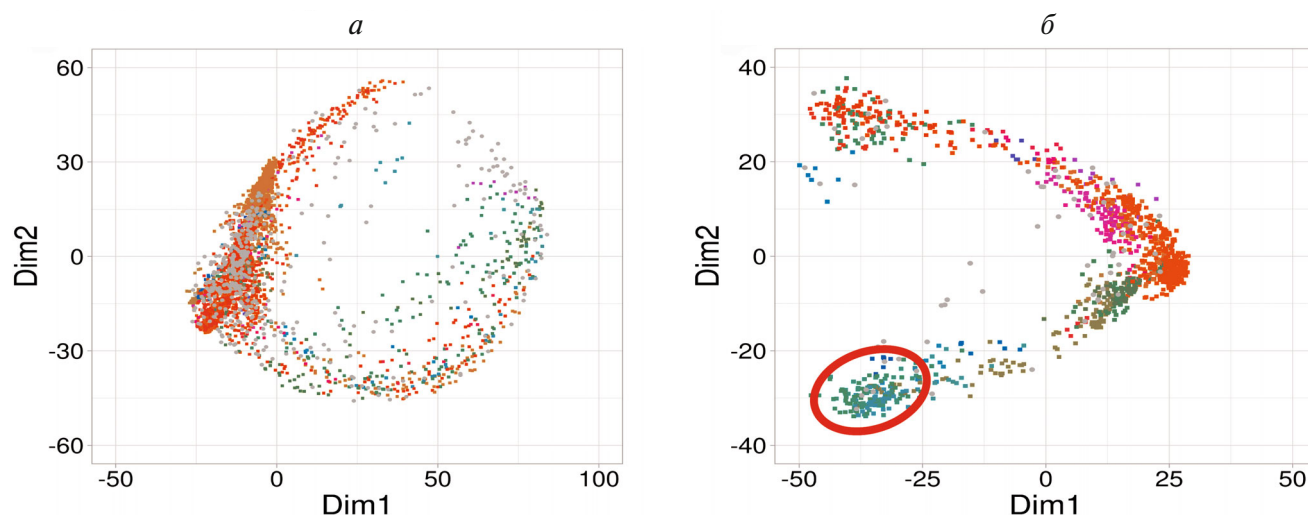


Рис. 5. Изучение расположения молекулы умифеновира на участке связывания ингибиторов конформационной перестройки гемагглютинаина H3N2. *a* – Кластеризация результатов докинга в структуры НА траектории классической молекулярной динамики: обособленного кластера, соответствующего кристаллографической структуре не образуется; *б* – кластеризация результатов докинга в структуры НА с расширенным состоянием участка связывания из метадинамики: красной границей показан кластер, соответствующий положению умифеновира в кристаллографической структуре. Цвет соответствует различным кластерам, Dim1 и Dim2 формируют пространство двух первых главных компонент, вычисленных для пространства конформаций и расположений умифеновира в результатах докинга. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

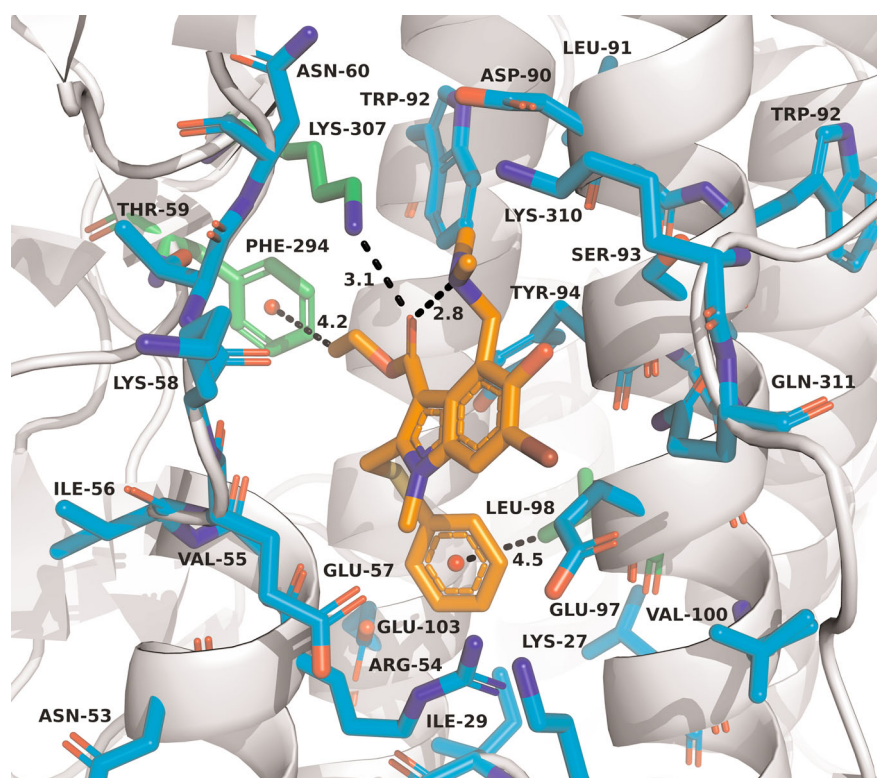


Рис. 6. Положение молекулы умифеновира в участке связывания ингибиторов структурной перестройки в НА H3N2. Оранжевыми толстыми линиями показана молекула умифеновира. Толстыми линиями показаны остатки, значения RMSD которых существенно увеличиваются с увеличением объема. Зеленым представлены остатки, отвечающие за непосредственное связывание умифеновира [9]. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

динамики, создает основу для изучения связывания ингибиторов. При оценке взаимодействий в рентгенографических структурах белок–ингибиторных комплексов, как правило, не учитывается энергетическое состояние самого участка. Характерным примером могут быть кристаллографические структуры комплексов гемагглютининов с умифеновиром. Докинг умифеновира был проведен с использованием наиболее энергетически выгодных состояний участка связывания отобранных из траекторий классической молекулярной динамики и метадинамики НА H3N2. При кластеризации результатов докинга в выбранный ансамбль конформационных состояний НА (рис. 5, а) не удалось обнаружить обособленного кластера со связанным ингибитором, положение которого соответствует кристаллографической структуре комплекса [9]. Образование комплекса было обнаружено только при кластеризации результатов докинга в структуры НА с расширенным состоянием участка связывания: обособленный кластер (значение $\epsilon = 2,6$), соответствующий результатам рентгеноструктурного анализа, представлен на рис. 5, б. Это также подтверждается тем фактом, что все аминокислотные остатки, с которыми умифеновир взаимодействует напрямую в структуре комплекса – Phe294, Lys307 цепи А и Leu98 цепи D – главным образом вовлечены в дестабилизацию наиболее выгодного энергетического состояния участка и увеличения его объема (см. рис. 3).

В НА H7N9 функционирование участка связывания ингибиторов структурной перестройки отличается от НА H3N2. В этом случае участок существует в двух конформационных состояниях – открытом и закрытом. Докинг показал, что связывание умифеновира имеет место лишь с открытым состоянием, при этом, в отличие от НА H3N2, нет необходимости в значительном увеличении объема участка. Положение ингибитора соответствует положению умифеновира в кристаллографической структуре. Особенность взаимодействия в случае НА H7N9 заключается в том, что открытое состояние участка не является наиболее энергетически выгодным и на 8 ккал/моль выше по сравнению с закрытым состоянием (рис. 6). Таким образом, и в этом

случае для связывания умифеновира необходим переход в менее энергетически выгодное состояние, связанный с перемещением остатка Arg54 и сопутствующим небольшим изменением объема участка.

Использование методов молекулярного моделирования позволило охарактеризовать наиболее энергетически выгодные состояния участков связывания ингибиторов конформационной перестройки гемагглютининов двух штаммов вируса гриппа H3N2 и H7N9 и установить, что в обоих случаях для взаимодействия с умифеновиром необходима существенная перестройка участка связывания по сравнению со структурой свободного белка. Выявлены аминокислотные остатки, формирующие участок связывания, а также непосредственно участвующие в связывании лиганда и определяющие эффективность этих взаимодействий. В обоих случаях перестройка участка связывания белка требует затрат энергии, но протекает по разным механизмам: для НА H3N2 необходимо увеличение объема участка связывания за счет смещения целого ряда аминокислотных остатков, тогда как для НА H7N9 достаточен переход в энергетически менее выгодную открытую форму за счет перемещения остатка Arg54 цепи В. Полученные знания могут быть полезны как для понимания механизма действия известных препаратов, так и при поиске новых лидерных соединений, направленных на модуляцию функциональных свойств гемагглютининов вирусов гриппа.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект 18-315-00390).

Благодарности. Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ им. М.В. Ломоносова [21].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin, *Ann. Rev. Biochem.*, **69**, 531-569, doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.531.
2. Hensley, S. E. (2014) Challenges of selecting seasonal influenza vaccine strains for humans with diverse pre-exposure histories, *Curr. Opin. Virology*, **8**, 85-89, doi: 10.1016/j.coviro.2014.07.007.
3. Hensley, S. E., Das, S. R., Bailey, A. L., Schmidt, L. M., Hickman, H. D., Jayaraman, A., Viswanathan, K., Raman, R., Sasisekharan, R., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W. (2009) Hemagglutinin receptor binding avidity drives influenza A virus antigenic drift, *Science*, **326**, 734-736, doi: 10.1126/science.1178258.
4. Heider, A., Mochalova, L., Harder, T., Tuzikov, A., Bovin, N., Wolff, T., Matrosovich, M., and Schweiger, B. (2015)

- Alterations in hemagglutinin receptor-binding specificity accompany the emergence of highly pathogenic avian influenza viruses, *J. Virology*, **89**, 5395-5405, doi: 10.1128/JVI.03304-14.
5. Tharakaraman, K., Raman, R., Viswanathan, K., Stebbins, N. W., Jayaraman, A., Krishnan, A., Sasisekharan, V., and Sasisekharan, R. (2013) Structural determinants for naturally evolving H5N1 hemagglutinin to switch its receptor specificity, *Cell*, **153**, 1475-1485, doi: 10.1016/j.cell.2013.05.035.
 6. Львов Д. К., Богданова В. С., Кириллов И. М., Шелканов М. Ю., Бурцева Е. И., Бовин Н. В., Федякина И. Т., Прилипов А.Г., Альховский С. В., Самохвалов Е. И., Прошина Е. С., Кириллова Е. С., Сыроешкин А. В. (2019) Эволюция пандемического вируса гриппа А(H1N1)рdm09 в 2009-2016 гг: динамика рецепторной специфичности первой субъединицы геммагглютинаина (HA1), *Вопросы вирусологии*, **64**, 63-72, doi: 10.18821/0507-4088-2019-64-2-63-72.
 7. Russell, R. J., Kerry, P. S., Stevens, D. J., Steinhauer, D. A., Martin, S. R., Gamblin, S. J., and Skehel, J. J. (2008) Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 17736-17741, doi: 10.1073/pnas.0807142105.
 8. Kadam, R. U., and Wilson, I. A. (2018) A small-molecule fragment that emulates binding of receptor and broadly neutralizing antibodies to influenza A hemagglutinin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 4240-4245, doi: 10.1073/pnas.1801999115.
 9. Kadam, R. U., and Wilson, I. A. (2017) Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 206-214, doi: 10.1073/pnas.1617020114.
 10. Han, N., Mu, Y., Miao, H., Yang, Y., Wu, Q., Li, J., Ding, J., Xu, B., and Huang, Z. (2016) The 340-cavity in neuraminidase provides new opportunities for influenza drug development: A molecular dynamics simulation study, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **470**, 130-136, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.007.
 11. Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., and Simmerling, C. (2015) ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB, *J. Chem. Theory Comput.*, **11**, 3696-3713, doi: 10.1021/acs.jctc.5b00255.
 12. Case, D. A., Babin, V., Berryman, J., Betz, R. M., Cai, Q., Cerutti, D. S., Cheatham III, T. E., Darden, T. A., et al. (2014) Amber 14, University of California, San Francisco.
 13. Barducci, A., Bonomi, M., and Parrinello, M. (2011) Metadynamics, *WIREs Comput. Mol. Sci.*, **1**, 826-843, doi: 10.1002/wcms.31.
 14. Tribello, G. A., Bonomi, M., Branduardi, D., Camilloni, C., and Bussi, G. (2014) PLUMED 2: new feathers for an old bird, *Com. Phys. Commun.*, **185**, 604-613, doi: 10.1016/j.cpc.2013.09.018.
 15. Sanner, M. (1999) Python: a programming language for software integration and development, *J. Mol. Graph. Model*, **17**, 57-61.
 16. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2009) AutoDock4 and autoDocktools4: automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.*, **16**, 2785-2791, doi: 10.1002/jcc.21256.
 17. Trott, O., and Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.*, **31**, 455-461, doi: 10.1002/jcc.21334.
 18. Ester, M., Kriegel, H.-P., Sander, J., and Xu, X. (1996) in *Proc. Sec. Intern. Conf. Knowl. Discov. Data Min.* AAAI Press, Portland, Oregon, pp. 226-231.
 19. Durrant, J. D., Votapka, L., Sørensen, J., and Amaro, R. E. (2014) POVME 2.0: an enhanced tool for determining pocket shape and volume characteristics, *J. Chem. Theory Comput.*, **10**, 5047-5056, doi: 10.1021/ct500381c.
 20. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph. Model.*, **14**, 33-38, doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
 21. Sadvonichy, V., Tikhonravov, A., Voevodin, V., and Opanasenko, V. (2013) "Lomonosov": supercomputing at Moscow State University, in *Contem. High Perform. Comp.*, Boca Raton, USA, pp. 283-307, doi: 10.1201/9781351104005-11.

STRUCTURAL ORGANIZATION AND DYNAMIC CHARACTERISTICS OF THE BINDING SITE OF CONFORMATIONAL REARRANGEMENT INHIBITORS OF HEMAGGLUTININ FROM H3N2 AND H7N9 INFLUENZA VIRUS*

D. D. Podshivalov^{1**}, E. M. Kirilin^{1,2}, S. I. Konnov¹, and V. K. Švedas^{1,2**}

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia; E-mail: david.podshivalov@belozersky.msu.ru, vyatas@belozersky.msu.ru

² Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Received February 4, 2020

Revised March 2, 2020

Accepted March 2, 2020

Computer models of the H3N2 and H7N9 influenza virus hemagglutinin have been developed to study structural organization and dynamic characteristics of the binding site of conformational rearrangement inhibitors. The use of metadynamics made it possible to map the free energy of these binding sites and define the volume of their most energetically favorable states. At simulation of the interaction of umifenovir with hemagglutinin it was shown that ligand binding requires an increase of the volume and deformation of the energetically most favorable state of the conformational rearrangement inhibitors binding site. Amino acid residues that are directly involved in ligand binding and determine the effectiveness of the interaction, as well as the dynamic behavior of the binding site of hemagglutinin inhibitors were identified. The revealed properties and peculiarities of the structural organization of the binding site of conformational rearrangement inhibitors of influenza virus hemagglutinin should be taken into account when searching for new antiviral drugs capable to modulate its functional properties.

Keywords: hemagglutinin, influenza virus, molecular dynamics, metadynamics