

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА Е ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ПОДТИПА ШТАММА СОФЬИН

© 2022 г. К. М. Дубова¹, А. В. Власкина², Д. А. Корженевский³, Ю. К. Агапова²,
Т. В. Ракитина², В. Р. Самыгина^{1,2,*}

¹Институт кристаллографии А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

³Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, Россия

*E-mail: lera@crys.ras.ru

Поступила в редакцию 21.02.2022 г.

После доработки 21.02.2022 г.

Принята к публикации 22.02.2022 г.

Оболочечный белок Е флавивирусов является привлекательной мишенью для разработки противовирусных препаратов, поскольку играет важную роль в процессе формирования вирусных частиц, а также инвазии вируса в клетку хозяина. Специфических противовирусных препаратов от клещевого энцефалита не существует. Работа посвящена изучению кристаллической структуры эктодомена оболочечного белка Е вируса клещевого энцефалита дальневосточного подтипа штамма Софьин. Знание пространственной структуры может быть основой для разработки специфических ингибиторов конформационных перестроек белка Е, являющихся существенными для первых этапов инфицирования.

DOI: 10.31857/S0023476122040063

ВВЕДЕНИЕ

Флавивирусы относятся к семейству *Flaviviridae* и могут быть разделены на три группы по типу переносчика инфекции: клещевые, комариные и флавивирусы с неизвестным переносчиком [1]. Известные патогены, поражающие человека, такие как вирус Зика, вирус Денге, вирус Западного Нила, переносятся комарами. Вирус клещевого энцефалита и вирус шотландского энцефалита овец относятся к флавивирусам, переносимым клещами. Они могут вызывать энцефалиты или менингоэнцефалиты центральной нервной системы. Вирус шотландского энцефаломиелита овец (ВШЭО) в основном поражает небольших животных, таких как овцы и красные тетерева. Изредка может поразить человека. Более широко распространенный вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), напротив, в основном поражает людей, хотя может поражать и грызунов. Вирус клещевого энцефалита распространен на евразийском континенте, в год регистрируется 10000–14000 случаев [2, 3]. Несмотря на наличие вакцин, уровень заражения ВКЭ остается довольно высоким из-за низкого процента вакцинации. Специфических лекарств от ВКЭ не существует. Одним из современных способов разработки лекарств является

так называемый “драг дизайн”, который основан на знании пространственной структуры мишени [4, 5]. В случае ВКЭ мишенью является оболочечный белок Е. Этот белок образует наружную поверхность вириона, обеспечивает стабильность вирусной частицы и определяет первые этапы инфекции – связывание с клеточными рецепторами, проникновение вируса в клетку, раздевание вирусной РНК [2].

Существуют три основных подтипа ВКЭ: центрально-европейский, сибирский и дальневосточный. На территории России распространены сибирский и дальневосточный подтипы. Каждый подтип содержит множество штаммов, имеющих небольшие различия в аминокислотной последовательности белков.

Целью работы было получить кристаллы эктодомена белка Е вируса клещевого энцефалита дальневосточного подтипа штамма Софьин, аминокислотная последовательность которого представлена на рис. 1, для дальнейшего анализа структуры апоформы белка, а также для детального структурного исследования взаимодействия белка с прототипами ингибиторов.

MRCTHLENRDFVTGTQGTTRVTLVLELGGCVTITAEKGKPSMDVWLD SIYQENPAKTREYCLHAKLSDTKV
 AARCPMTGPFATLAEENHQSQTVCCKRDQSDRGWGNHCGLFGKGSIVTCVKASCEAKKATGHVYDANKIVYT
 VKVEPHTGDYVAANETHSGRKTASFTVSSERTILTMGDYGDVSLLCRVASGVDLAQTIVILELDKTSEHLP
 TAWQVHRDWFNDLALPWKHEGAQNWNNAERLVEFGAPHAVKMDVYNLGDQTVLLKSLAGVPVAHIDGTK
 YHLKSGHVTCSEVGLEKLMKGLTYTMC DKTKFTWKRIPTDSGHDTVMEVAFSGTKPCRIPVRAVAHGSP
 DVNVAMLMTPNPTIENNGGGFIEMQLPPGDNI IYVGELSHQWFQK

Рис. 1. Аминокислотная последовательность (участок 1–395) эктодомена белка Е вируса клещевого энцефалита, дальневосточный подтип, штамм Софьин (код в базе UniProt P07720).

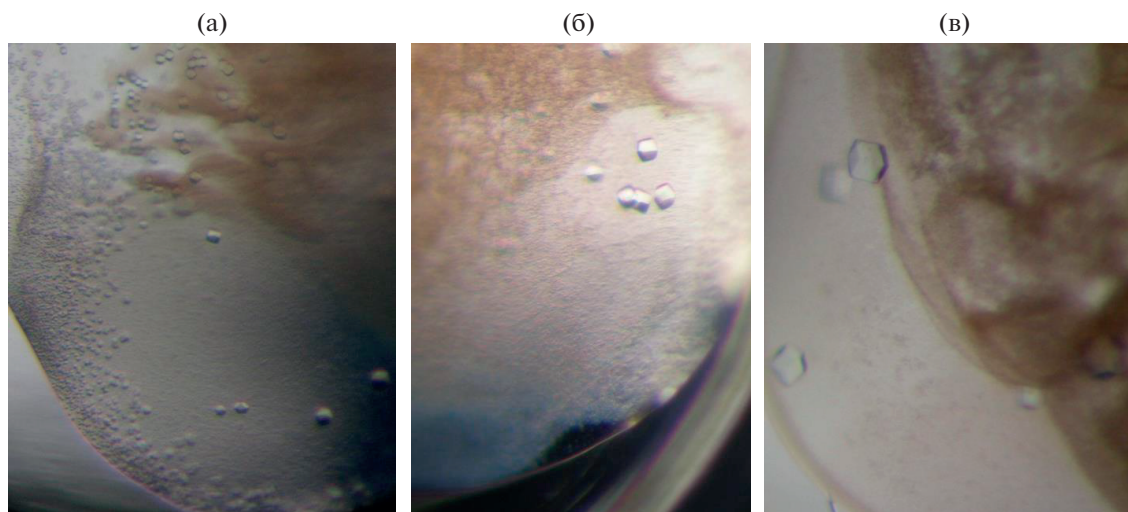


Рис. 2. Кристаллы эктодомена белка Е вируса клещевого энцефалита, дальневосточный подтип, штамм Софьин: при начальных условиях кристаллизации (а); при условиях после оптимизации (б, в).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение, очистка эктодомена белка Е. Штамм-продуцент рекомбинантного эктодомена белка Е получен путем трансформации клеток штамма *E. coli* BL21(DE3) RIPL рекомбинантной плазмидой pET22. Белок выделяли из телец включения посредством рефолдинга, используя методику, приведенную в [6]. Супернатант концентрировали на касетах VIVAFLOV 200, PES-мембрана, 10 кДа (Sartorius stedim LAB Ltd), затем на центрифужном концентраторе, 10 кДа (Millipore, Burlington, MA, США), и отфильтровали через фильтр с размером пор 0.22 мкм (PES-мембрана Millipore Millex-GP). Целевой белок очищали методом гель-фильтрации с использованием колонки HiLoad 16/600 Superdex 200prep grade (GE Healthcare, Швеция).

Кристаллизация эктодомена белка Е(sE). Подбор условий кристаллизации мономера и димера эктодомена белка Е проводили методом диффузии в парах в варианте сидячей капли. Капли получали смешиванием 0.7 мкл раствора белка концентрации 5 мг/мл с 0.7 мкл резервуарного раствора. Объем резервуарного раствора составлял

200 мкл. Поиск первоначальных условий кристаллизации белка проводили с использованием планшетов Intelli-Plate 48-3 (Hampton Research). Поиск условий кристаллизации был проведен с использованием коммерческих скринингов Hampton Research при температуре 20°C. Было выявлено, что ограниченные монокристаллы вырастают в кислых буферных системах. Определены начальные условия кристаллизации: 2.0 М сульфата аммония в 0.1 М цитратном буфере, pH 4.0. В этих условиях получены мелкие кристаллы (рис. 2а). Найденные условия оптимизировали путем варьирования концентрации сульфата аммония, pH буфера и использования добавок: полиэтиленгликоля, глицерина и 2-метил-2,4-пентандиола (МПД), пока не были найдены условия, в которых вырастали монокристаллы размером не менее 0.1 мм.

Сбор дифракционных данных и предварительный рентгеноструктурный анализ. Кристаллы для получения набора дифракционных данных перенесли в криораствор, используя криопетлю (Hampton Research), на 15 с. Наряду с компонентами кристаллизационного раствора криораствор

содержал дополнительно 20% глицерина. Затем кристаллы в петле помещали в металлическую кассету, совместимую с автоматической системой смены образцов и находящуюся в жидком азоте. Сбор дифракционных данных проводили при 100 К на станции синхротронного излучения ID30В синхротрона ESRF (Гренобль, Франция) с использованием детектора PILATUS3 6М (Dectris). Данные обрабатывали с использованием программ XDS и XSCALE [7]. Статистика дифракционных наборов приведена в табл. 1, набор собран до разрешения 3.2 Å. Структура решена методом молекулярного замещения по программе MOLREP [8] с использованием структуры эктодомена белка E ВШЭО (Louping ill virus), уточненной до разрешения 3.6 Å (pdb код 6J5C) [1], в качестве стартовой модели. Полученная модель была уточнена до промежуточного R-фактора 22.6% по программе Refmac [9]. Структуру анализировали с использованием программ Coot [10], PyMol [11] и комплекса программ CCP4 [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначальный поиск условий кристаллизации проведен методом диффузии паров растворителя в сидячей капле с использованием коммерческих кристаллизационных наборов фирмы Hampton Research. Найденные условия оптимизировали для получения кристаллов размером 0.1–0.15 мм, которые удовлетворяют требованиям, предъявляемым к кристаллам, пригодным для рентгеноструктурного анализа (рис. 2). Для этого концентрацию сульфата аммония понизили на 0.2–0.4 М по сравнению с исходной, изменили pH и добавили МПД, что позволило сократить количество кристаллов, образующихся в капле, и получить монокристаллы большего размера. Поскольку белок не обладает высокой растворимостью, концентрацию белка не меняли. Наилучшие кристаллы выращены в 1.6–1.8 М сульфате аммония с 2%-ным МПД в 0.1 М цитратном буфере, pH 4.5. Кристаллы выросли до 0.1–0.15 мм в течение двух–трех дней (рис. 2б).

Дифракционные наборы от замороженных кристаллов были собраны при 100 К на источнике синхротронного излучения ESRF. Обработка данных показала, что наивысшее пространственное разрешение составляет 3.2 Å. Кристаллы принадлежат кубической пр. гр. $P4_121$ с параметрами элементарной ячейки $a = b = c = 165.061$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Независимая часть элементарной ячейки кристалла содержит одну молекулу. Ход полипептидной цепи сходен с ходом полипептидной цепи в структуре эктодомена белка E ВКЭ центрально-европейского подтипа, штамм Ньюдорфф (код pdb 1SVB) [13], а также эктодомена белка E ВШЭО (pdb код 6J5C) (рис. 3). Причем конформация эктодомена белка E ВШЭО, кри-

Таблица 1. Статистические характеристики дифракционных данных

Пр. гр.	$P4_121$
$a = b = c$, Å	165.06
$\alpha = \beta = \gamma$, град	90
Длина волны, Å	0.899990
Расстояние детектор–кристалл, см	590
Шаг сканирования, град	0.1
Угол сканирования, град	360
Мозаичность, град	0.073
Область разрешения, Å	50.00–3.2 (3.42–3.2)*
Количество рефлексов	1285978
Количество уникальных рефлексов	50365
Полнота набора, %	100 (100)
$I/\sigma(I)$	32.5 (3.6)
Повторяемость	75.9 (65.4)
R_{pim}	0.023 (0.221)
R_{merge}	0.145 (1.775)

* В скобках приведены значения для слоя наивысшего разрешения.

сталлы для исследования структуры которого получены в похожих кристаллизационных условиях, имеет меньше различий с конформацией изучаемой структуры, несмотря на меньшую гомологию [1], особенно в области домена III. При наложении молекулы полученной структуры по Cα-атомам на молекулу структуры 6J5C среднеквадратичное отклонение (rmsd) составляет 0.546 Å, а при наложении на молекулу структуры 1SVB – 1.519 Å. Отметим, что структура 1SVB получена из эктодомена белка E ВКЭ западного подтипа (штамм Ньюдорфф), “срезанного” с поверхности вирусных частиц трипсином. В данной работе получена структура рекомбинантного белка, экспрессированного в бактериальной системе экспрессии. Тем не менее схожесть конформаций рекомбинантного белка и природного показывает, что растворимая часть белка E, экспрессированная в *E. coli*, подходит для детального структурного исследования взаимодействия белка с ингибиторами. В настоящее время структура уточняется.

Работа показала, что, несмотря на выбор бактериальной системы экспрессии для получения

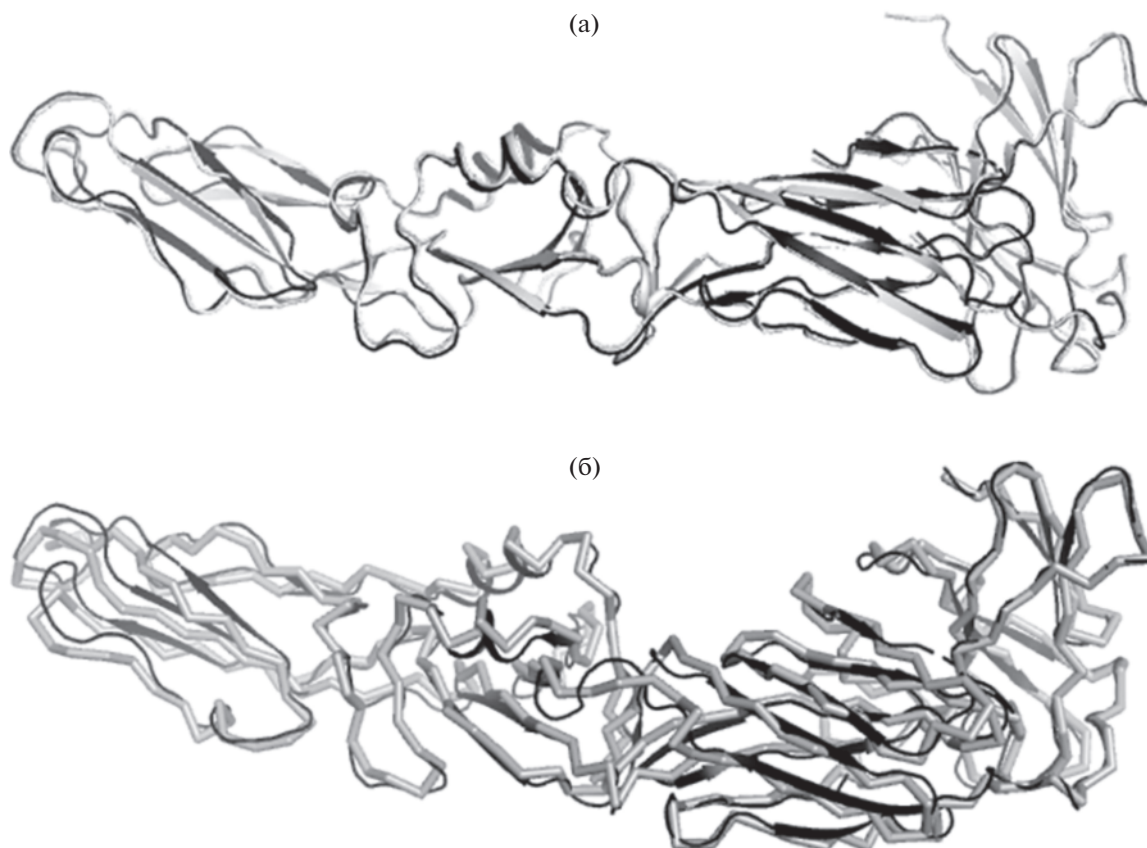


Рис. 3. Совмещение структуры sE, полученной в настоящей работе, со структурами 6J5C (а) и 1SVB (б). Структуры 6J5C и 1SVB показаны темным цветом.

рекомбинантного белка E, конформация молекулы близка к наблюдаемой в частице вируса, поэтому кристаллы такого белка могут быть использованы для рентгеноструктурного анализа комплексов с прототипами ингибиторов белка E. Однако, поскольку из-за низкой растворимости ингибиторов наиболее часто используемый метод получения кристаллов с целью использования их для исследования кристаллических структур таких комплексов – настаивание, при котором, как правило, ухудшается пространственное разрешение кристаллов, найденные условия кристаллизации не являются оптимальными. Разрешение, при котором можно провести достоверный анализ деталей связывания ингибиторов с белком, составляет не менее 2.5 Å [5]. Разрешение кристаллов в процессе настаивания, вероятно, понизится, поэтому полученные кристаллы с разрешением 3.2 Å не дадут возможности получить кристаллические комплексы, обеспечивающие требуемую высокую детальность.

В связи с этим проводится поиск условий кристаллизации белка sE, позволяющих получить структуру с разрешением около 2 Å.

Авторы выражают благодарность ESRF за обеспечение эксперимента по сбору дифракционных данных на синхротроне.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-02-40026), в рамках темплана НИЦ “Курчатовский институт” и при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Xu Yang, Jianxun Qi, Ruchao Peng et al.* // *J. Virology*. 2019. V. 93. № 8. P. e02132. <https://doi.org/10.1128/JVI.02132-18>
2. *Fuzik T., Formanova P., Růžek D. et al.* // *Nature Commun.* 2018. V. 9. P. 436. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02882-0>
3. *Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A.* // *Antiviral Res.* 2003. V. 57. P. 129. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.1.25-36.2003>

4. *Jaeyoung Ha, Hankum Park, Jongmin Park, Seung Bum Park* // Cell Chem. Biol. 2021. V. 28. № 3. P. 394.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.12.001>
5. *Bradley A.R., Echaliier A., Fairhead M. et al.* // Essays Biochem. 2017. V. 61. № 5. P. 495.
<https://doi.org/10.1042/EBC20170051>
6. *Lianpan Dai, Jian Song, Xishan Lu et al.* // Cell Host. Microbe. 2016. V. 19. P. 696.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.013>
7. *Kabsch W.* // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 125.
<https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
8. *Vagin A.A., Teplyakov A.* // J. Appl. Cryst. 1997. V. 30. P. 1022.
<https://doi.org/10.1107/S0021889897006766>
9. *Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A. et al.* // Acta. Cryst. D. 2011. V. 67. P. 355.
<https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>
10. *Emsley P., Lohkamp B., Scott W. et al.* // Acta. Cryst. D. 2010. V. 66. P. 486.
<https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
11. *DeLano W.L., Lam J.W.* // Abstr. Papers Am. Chem. Soc. 2005. V. 230. P. 1371.
12. Collaborative Computational Project Number 4 // Acta Cryst. D. 1994. V. 50. P. 760.
<https://doi.org/10.1107/S0907444994003112>
13. *Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C. et al.* // Nature. 1995. V. 375. P. 291.