

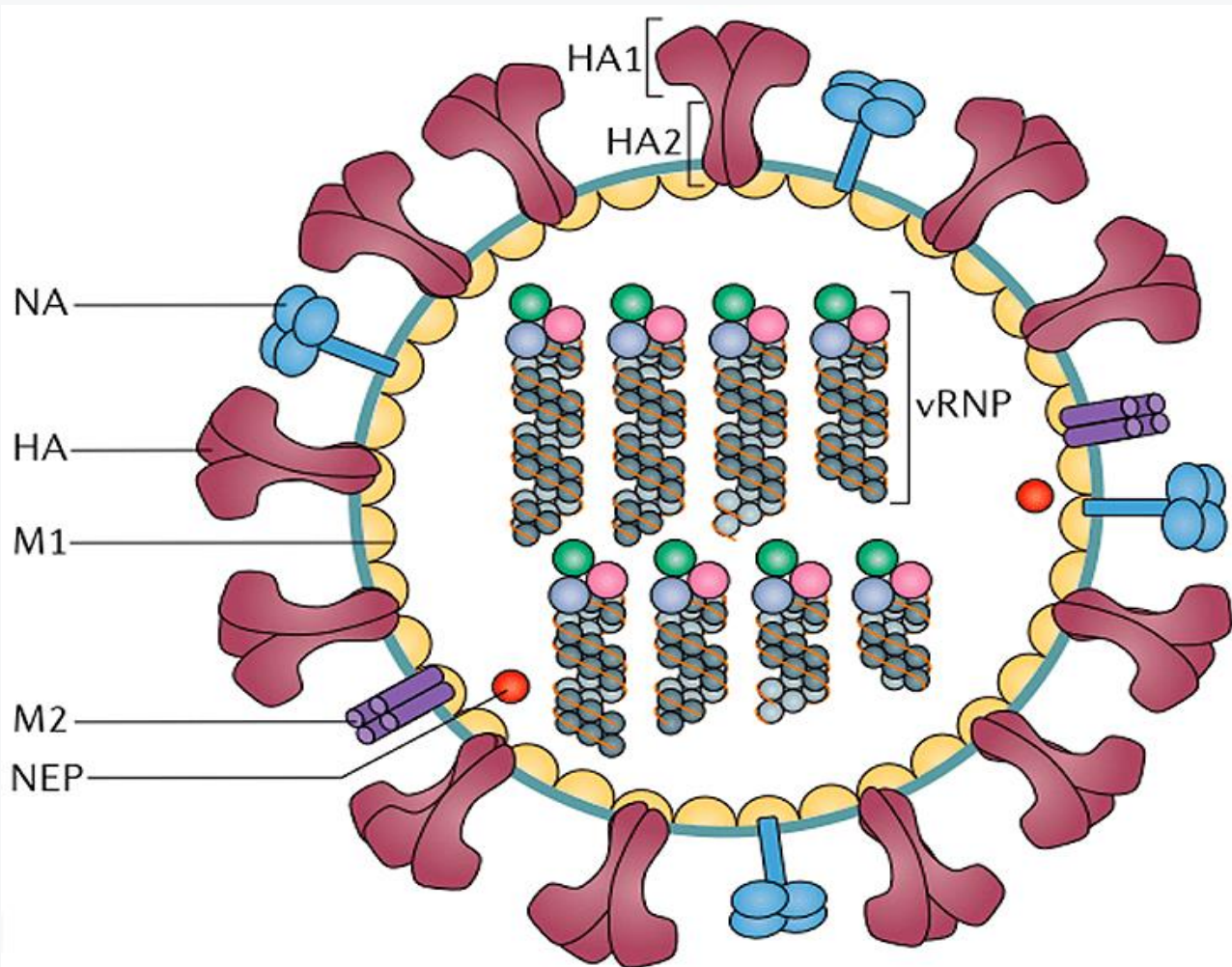
**ДИЗАЙН ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ
ИЗ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
ВИРУСОВ ГРИППА А
H1N1 И H3N2**

Тарасик М.С., Хрусталёв В.В., Хрусталёва О.В., Жарская С.М. Матусевич П.В.

Работа выполнена в рамках гранта БРФФИ-НФЕНК Б25КИ-046, номер государственной регистрации 20250457 от 21.04.2025

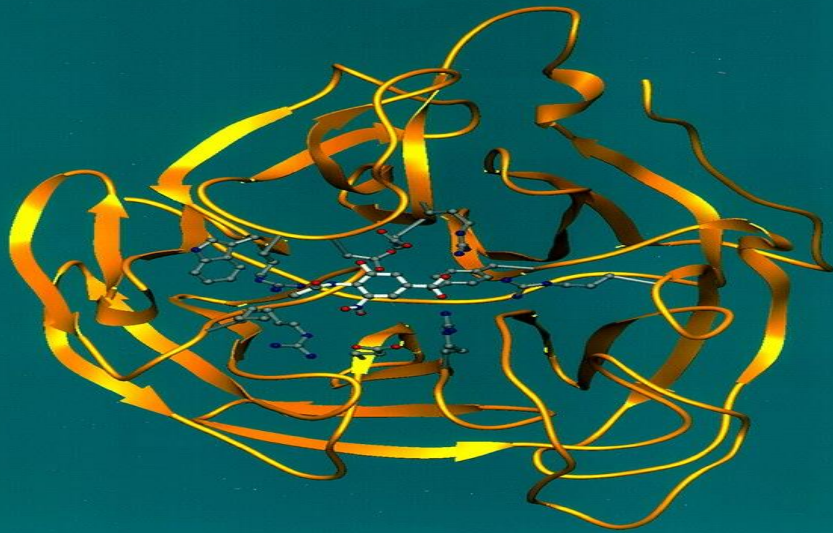
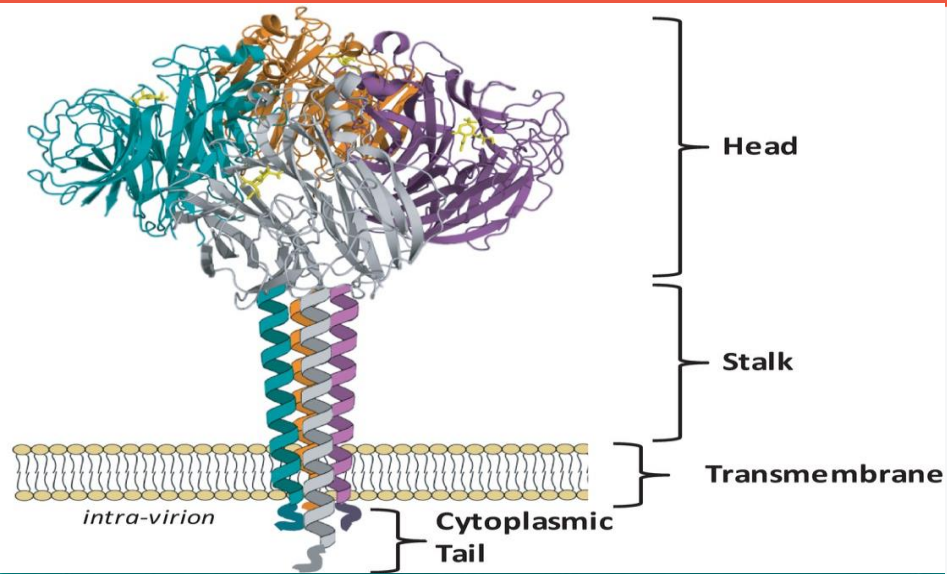


Строение вируса гриппа

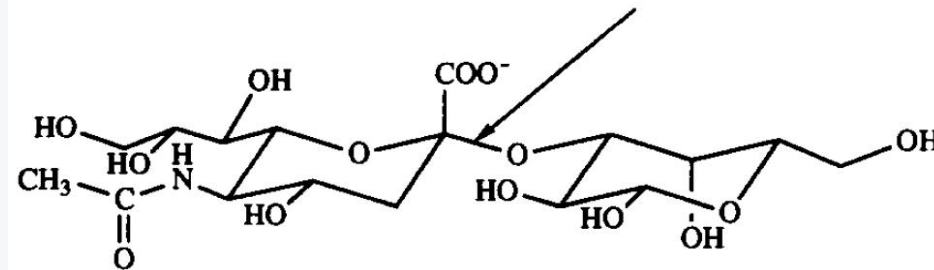


- Семейство **Orthomyxoviridae**
- **геном** - одноцепочечная (-)РНК из 8 фрагментов, кодирующая 10 белков
- **NA** - грибоподобный тетрамер нейраминидазы
- **HA** - тример гемагглютинина
- **M1** - матриксный белок
- **M2** - тетрамер, формирует ионный канал
- **NEP** - белок, участвует в транспорте вирусных рибонуклеопротеидов из клеточного ядра для упаковки в дочерние вирионы в цитоплазме клетки.

Нейраминидаза: строение



- Полипептидная цепь NA вируса гриппа А состоит из 470 аминокислотных остатков.
- В третичной структуре NA выделяют структурно-функциональные домены: цитоплазматический, трансмембранный, «стебель», «голову».
- В голове NA расположен активный центр и кальцийсвязывающий домен.
- Активный центр фермента сформирован функциональными остатками Arg118, Asp151, Arg152, Arg224, Glu276, Arg292, Arg371 и Tyr406, а также структурными остатками Glu119, Arg156, Trp178, Ser179, Asp98, Ile222, Glu227, Glu277, Asp293 и Glu425.
- В NA найдено 8 консервативных дисульфидных мостиков и один дополнительный – в подтипах N2, N8, и N9.



Нейраминидаза: функции

НА необходима вирусу гриппа на различных стадиях инфекционного цикла:

- облегчает доступ к клеткам дыхательных путей расщеплением сиаловых кислот, содержащихся в слизи;
- НА ответственна за разрушение мембраны клетки, способствуя проникновению РНК вируса в цитоплазму клетки;
- НА усиливает гемагглютинирующую активность НА посредством отщепления терминальных остатков нейраминовой кислоты от олигосахаридов, окружающих рецептор-связывающий участок НА;
- После сборки вирусов внутри клетки – способствует выходу вирусов из клетки, тем самым приводя к окончательному её разрушению;
- Благодаря нейраминидазе вырабатывается нечувствительность ко многим противовирусным препаратам.

- Трехмерные модели пептидов были получены с помощью сервера Rosetta по аминокислотным последовательностям, соответствующим границам бета-шпильки, содержащей гидрофильную петлю, нависающую над активным центром фермента, к которой вырабатываются антитела с нейтрализующей активностью. Последствия замен оценивались по двум критериям: **изменение термостабильности бета-тяжа** и **сама вероятность формирования бета-тяжа**. В каждом случае использовались две шкалы: аминокислотная и пентапептидная.

AlphaBetterWOpeptideN2rosetta - Excel

Вход

Общий доступ

Главная

Вставка

Разметка страницы

Формулы

Данные

Рецензирование

Вид

Справка

Помощник

Общий доступ

Буфер обмена

Шрифт

Выравнивание

Число

Стили

Условное форматирование

Форматировать как таблицу

Стили ячеек

Ячейки

Редактирование

Надстройки

Надстройки

H14

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13																				
14																				
15																				
16																				
17																				
18																				
19																				
20																				
21																				
22																				
23																				
24																				
25																				
26																				
27																				
28																				
29																				

Готово

Специальные возможности: проверьте рекомендации

78 %

15:57:19

04.10.2025

Рус

Rain tomorrow

На трёхмерных моделях пептидов как из нейраминидазы N1, так и из нейраминидазы N2, второй бета-тяж уже содержит комбинацию аминокислотных остатков, характерную для термостабильных белков (дипептид SI).

В результате анализа последствий аминокислотных замен в первом бета-тяже пептида из нейраминидазы N1 был выявлен только один вариант, повышающий его термостабильность: замена Leu на Ile в пятом положении. Такая замена приводит к появлению комбинации “VXI”, которая чаще встречается в бета-тяжах термостабильных белков. Кроме того – Ile является сильным формирователем бета-структуры, в то время как Leu несколько чаще используется в альфа-спиралях, а не в бета-структуре.

последовательность	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
пептид из нейраминидазы N1	F	Y	V	E	L	I	R	G	R	P	E	E	N	T	I	W	T	S	G	S	S	I	S	F	C
аминокислотные замены	F	W	V	E	I	I	T	G	R	P	E	E	N	T	I	W	T	S	G	S	S	I	S	F	C

AlphaBetterWOpeptideN2rosetta ЗАМЕНЫ АК - Excel

Вход

Файл Главная Вставка Разметка страницы Формулы Данные Рецензирование Вид Справка Помощник Общий доступ

Calibri 11

Ж К Ч А А

Общий

Условное форматирование

Форматировать как таблицу

Стили ячеек

Ячейки Редактирование Надстройки

Буфер обмена Шрифт Выравнивание Число Стили

T717

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y
700	26	C	?	?		C	C					C	C	C	EC							0		
701																								
702		sequence	AA	WO	Mutations	helical p	structural p	Higher	0,75	Lower	0,6			USSA		Stable alp	Stable bet	Helix by all	Beta by bc	Stable coil	Halfstable	mal stabil	ble alpha h	ble beta str
703	1	F				C	C					C	C	C	CE									
704	2	Y				C	C	Coil	0,6			C	C	C	EE							0		
705	3	V	E	E		E	E					E	E	E	EE			3				2,36546		E
706	4	E	E	H		H	E					H	E	E	EE					4		0		
707	5	L	E	H		H	E					H	E	E	EE					5		0		
708	6	I	E	H		H	E					H	E	E	EE					6		0		
709	7	T	E	E	T	C	C					C	C	E	EE							1,84172		
710	8	G	C	C		C	C					C	C	C	ECE							8	0	
711	9	R	C	C		C	C					C	C	C	ECE							9	0	
712	10	K	C	C		C	C					C	C	C	ECE							10	0	
713	11	E	H	C		H	H					H	H	C	ECE							11	0	
714	12	E	H	C		H	H					H	H	C	ECE							12	0	
715	13	T	H	C		H	H					H	H	C	ECE							13	0	
716	14	E	H	C		H	H					H	H	C	ECE							14	0	
717	15	V	E	H		H	E					H	E	C	ECE							0		
718	16	L	E	E		E	E					E	E	C	ECE							0		
719	17	W	E	E		C	C					C	C	C	ECE							0		
720	18	T	C	C		C	C					C	C	C	ECE							0		
721	19	S	C	C		C	C					C	C	C	EE							0		
722	20	N	C	C		C	C					C	C	C	EE							0		
723	21	S	E	C		E	E					E	E	E	EE			21				2,17008		E
724	22	I	E	H		H	E					H	E	E	EE					22		0		
725	23	V	E	E		E	E					E	E	E	EE							0		E
726	24	V	E	E		E	E					E	E	E	EE			23				0		E
727	25	F	?	?		C	C					C	C	C	EC							0		
728	26	C	?	?		C	C					C	C	C	EC							0		
729																								
730		sequence	AA	WO	Mutations	helical p	structural p	Higher	0,75	Lower	0,6			USSA		Stable alp	Stable bet	Helix by all	Beta by bc	Stable coil	Halfstable	mal stabil	ble alpha h	ble beta str
731	1	F				C	C					C	C	C	CE							0		
732	2	Y				C	C	Coil	0,6			C	C	C	EE							0		
733	3	V	E	E		E	E					E	E	E	EE							0		E
734	4	E	E	H		H	E					H	E	E	EE					4		0		
735	5	L	E	H		H	E					H	E	E	EE					5		0		

Лист1

Готово Специальные возможности: все в порядке

13°C Mostly sunny 16:11:05 04.10.2025

- Далее отбор замен осуществлялся исходя из того, что изменения в аминокислотной последовательности не должны понижать вероятность формирования бета-тяжа. Исключены были и замены гидрофобных остатков на гидрофильные, гидрофильных остатков на гидрофобные, введение дополнительных ароматических остатков. В результате среди «разрешенных» осталась только замена Arg на Thr в седьмом положении.

AlphaBetterWOpeptideN2rosetta ЗАМЕНЫ АК - Excel

Вход

Файл Главная Вставка Разметка страницы Формулы Данные Рецензирование Вид Справка Помощник Общий доступ

Вставить Буфер обмена Шрифт Выравнивание Число Стили

Общий Условное форматирование Форматировать как таблицу Стили ячеек Ячейки Редактирование Надстройки

F116 W

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y
111	25	F	?	?		C	C					C	C	C	EC							0		
112	26	C	?	?		C	C					C	C	C	EC							0		
114		sequence	AA	WO	Mutations	helical p	structural p	Higher	0,75	Lower	0,6			USSA		Stable alp	Stable bet	Helix by al	Beta by be	Stable coil	Halfstable	mal stabil	ble alpha	hole beta str
115	1	F				C	C					C	C	C	CE									
116	2	W			W	C	C	Coil	0,6			C	C	E	EE							0		
117	3	V	E	E		E	E					E	E	E	EE			3				3,18254		E
118	4	E	E	H		H	E					H	E	E	EE					4		0		
119	5	L	E	H		H	E					H	E	E	EE					5		0		
120	6	I	H	H		H	H					H	H	E	EE							0		
121	7	R	E	E		C	C					C	C	E	EE							0		
122	8	G	C	C		C	C					C	C	C	ECE							8		
123	9	R	C	C		C	C					C	C	C	ECE					9		9		
124	10	K	C	C		C	C					C	C	C	ECE							10		
125	11	E	H	C		H	H					H	H	C	ECE							11		
126	12	E	H	C		H	H					H	H	C	ECE							12		
127	13	T	H	C		H	H					H	H	C	ECE							13		
128	14	E	H	C		H	H					H	H	C	ECE							14		
129	15	V	E	H		H	E					H	E	C	ECE							0		
130	16	L	E	E		E	E					E	E	C	ECE							0		
131	17	W	E	E		C	C					C	C	C	ECE							0		
132	18	T	C	C		C	C					C	C	C	ECE							0		
133	19	S	C	C		C	C					C	C	E	EE							0		
134	20	N	C	C		C	C					C	C	E	EE							0		
135	21	S	E	C		E	E					E	E	E	EE							2,17008		E
136	22	I	E	H		H	E					H	E	E	EE							0		
137	23	V	E	E		E	E					E	E	E	EE							0		E
138	24	V	E	E		E	E					E	E	E	EE							0		E
139	25	F	?	?		C	C					C	C	C	EC							0		
140	26	C	?	?		C	C					C	C	C	EC							0		
141																								
142		sequence	AA	WO	Mutations	helical p	structural p	Higher	0,75	Lower	0,6			USSA		Stable alp	Stable bet	Helix by al	Beta by be	Stable coil	Halfstable	mal stabil	ble alpha	hole beta str
143	1	F				H	C					H	C	C	CE									
144	2	Y				H	C	Coil	0,6			C	C	E	EE							0		
145	3	K	H	H	K	H	H					H	H	E	EE							0		
146	4	E	H	H		H	H					H	H	E	EE							0		

Лист1

Готово Специальные возможности: все в порядке

13°C Mostly sunny 16:12:54 04.10.2025

- во втором положении пептида из нейраминидазы N2 появился Trp вместо Tyr, как у гомологичного пептида из N1.

В совокупности введение трёх замен в последовательность пептида из нейраминидазы N2 (Tyr2Trp; Leu5Ile; Arg7Thr) приводит к появлению сразу нескольких комбинаций, характерных для термостабильных бета-тяжей: “VXI”; “IXT”; “WXXI”; “WV”; “VXXHT”.

последовательность	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
пептид из нейраминидазы N1	F	Y	V	E	L	I	R	G	R	P	E	E	N	T	I	W	T	S	G	S	S	I	S	F	C	
аминокислотные замены	F	W	V	E	I	I	T	G	R	P	E	E	N	T	I	W	T	S	G	S	S	I	S	F	C	
пептид из нейраминидазы N2	F	Y	V	E	L	I	R	G	R	K	E	E	T	E	V	L	W	T	S	N	S	I	V	V	F	C
аминокислотные замены	F	W	V	E	I	I	T	G	R	K	E	E	T	E	V	L	W	T	S	N	S	I	V	V	F	C

- **аминокислотные замены:**
- замена Trp на Tyr во втором положении (Tyr2Trp);
- замена Leu на Ile в пятом положении (Leu5Ile);
- замена Arg на Thr в седьмом положении (Arg7Thr).

- В результате *in silico* мутагенеза с помощью **оригинального** алгоритма **«AlphaBetter»** был осуществлён дизайн термостабильного пептида из нейраминидазы N1 (**FWVEIITGRPEENTIWTSGSSISFC**) и из нейраминидазы N2 (**FWVEIITGRKEETEVLWTSNSIVVFC**) вируса гриппа А путём модификации N-концевого фрагмента, приводящей к возникновению **пяти** комбинаций аминокислотных остатков, **повышающих термостабильность** бета-структуры.
- Работа выполнена в рамках гранта БРФФИ-НФЕНК Б25КИ-046, номер государственной регистрации 20250457 от 21.04.2025.