

ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 577.35

МОДЕЛЬ КОМПЛЕКСА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ВИРУСА SARS-CoV-2 С ФАВИПИРАВИРОМ

© 2021 г. И. В. Поляков^{1,2}, Б. Л. Григоренко^{1,2}, А. В. Немухин^{1,2*}

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: anetukhin@yahoo.com

Поступила в редакцию 02.07.2020;

после доработки 27.07.2020;

принята в печать 21.09.2020

Методами молекулярного моделирования построена модель многодоменного комплекса, объясняющая механизм ингибирующего действия фавипиравира на РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp) коронавируса SARS-CoV-2. В качестве начальных атомных координат использованы данные криоэлектронной микроскопии для апо-формы RdRp вируса SARS-CoV-2 и данные по структуре RdRp вируса гепатита С. После соответствующих замен сконструирован комплекс RdRp, содержащий цепочки РНК, и потенциальный ингибитор фермента — фавипиравир в форме рибозатрифосфата. Методами молекулярной динамики оптимизирована структура комплекса в водных оболочках, включающая более ста тысяч атомов. Анализ активного центра с включенной молекулой фавипиравира позволяет объяснить химическую реакцию фермента с ингибитором.

Ключевые слова: молекулярная динамика, коронавирус, РНК-полимераза, механизм реакции, ингибирование, фавипиравир.

DOI: 10.31857/S0207401X21020138

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия коронавируса COVID-19 стимулировала активное изучение молекулярных процессов, протекающих во всех компонентах вируса SARS-CoV-2, включая важнейший его участок — РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), ответственную за репликацию и транскрипцию генетической информации [1]. Потенциальные ингибиторы RdRp рассматриваются как перспективные лекарственные препараты для лечения болезни, и одним из наиболее интересных кандидатов является фавипиравир [2]. Следует отметить, что на момент написания статьи соответствующий препарат одобрен Минздравом РФ для лечения COVID-19.

На рис. 1 схематично показан механизм химических превращений в активном центре РНК-полимеразы. При депротонировании атома $O^{3'}$ рибозы концевой нуклеотида в цепи $NB(i)$ (левая часть рис. 1) происходит нуклеофильная атака $O^{3'}$ на атом P^A свободного нуклеотида $NB(i+1)$ (центральная часть рис. 1), что приводит к разрыву связи P^A-O^{3A} , отщеплению пирофосфата и наращиванию цепи РНК (правая часть рис. 1). В качестве обобщенного основания (В) на стадии депротонирования может выступать аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты. В активном центре присутствуют ионы металла M_A^{2+} , M_B^{2+} , где М —

магний или марганец, координирующие отрицательно заряженные группы реагентов.

Нарушение функционирования этой молекулярной машины приводит к блокированию размножения вируса. На рис. 2 показана молекула фавипиравира (в соединении с рибозатрифосфатом — FTRP), которая может конкурировать с нативными субстратами фермента в активном центре и остановить нежелательный синтез РНК-вируса.

Данная работа направлена на исследование физико-химических аспектов биомолекулярных процессов, связанных с ингибированием важнейшего фермента RdRp вируса SARS-CoV-2. Мы используем средства молекулярного моделирования для построения и анализа активного центра РНК-полимеразы с включенной молекулой фавипиравира. Полученные в 2020 г. данные криоэлектронной микроскопии для апо-формы RdRp [3], а также известные результаты по кристаллической структуре RdRp вируса гепатита С [4] предоставляют начальную структурную информацию, на основе которой возможно довести моделирование до анализа молекулярных групп в конфигурации фермента с кофактором (фавипиравиром в форме рибозатрифосфата), имитирующей фермент-субстратный комплекс. Сведения о механизме химической реакции в РНК-полимеразе [5], а также опыт моделирования катализируемых ферментами реакций преобразования нуклеозидтрифосфатов

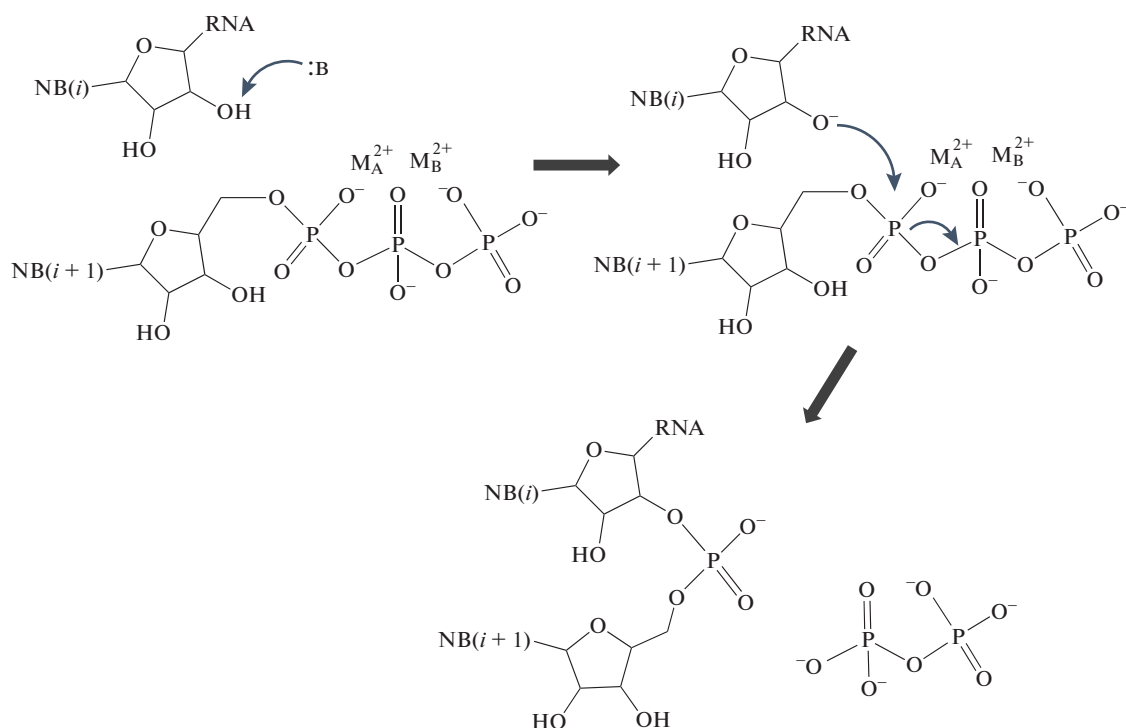


Рис. 1. Механизм химических преобразований в активном центре РНК-полимеразы.

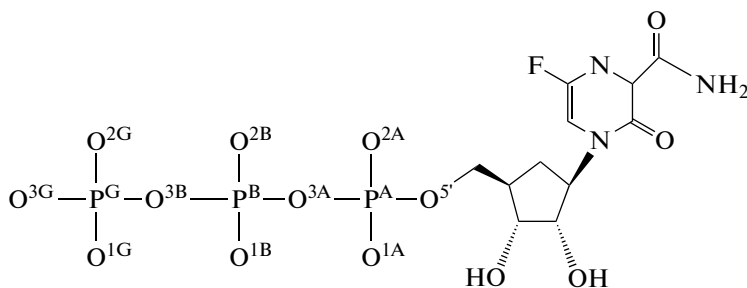


Рис. 2. Молекула фавипиравир-рибозатрифосфата (FRTF).

методами квантовой механики/молекулярной механики [6, 7] позволяют объяснить ингибирующее действие фавипиравира.

МОДЕЛИ И МЕТОДЫ

Как и все коронавирусы, SARS-CoV-2 использует многодоменную архитектуру молекулярной машины для репликации и транскрипции своей РНК. После расщепления вирусных полипротеинов образуется набор неструктурированных белков (nsp), три из которых входят в минимальную конфигурацию, обеспечивающую функционирование комплекса, а именно, nsp12 (RdRp), nsp7 и nsp8. В работе [3] сообщается о структуре комплекса nsp12–nsp7–nsp8 без цепей РНК и кофакторов с разрешением в 2.9 Å (PDB ID: 6M71). В качестве дополнительного источника структурных данных мы использовали результаты рентгеноструктурного анализа [4] для фермента RdRp

вируса гепатита С. Соответствующая структура PDB ID: 4WTG наряду с комплексом nsp12–nsp7–nsp8 содержит цепочки РНК, кофакторы (ионы Mn^{2+}), а также соединение софосбувир (в форме рибозадифосфата). Использование процедуры выравнивания позволило провести сравнение начальной структуры PDB ID: 6M71 и активного центра фермента в структуре PDB ID: 4WTG. Далее ионы Mn^{2+} были заменены на Mg^{2+} , а софосбувир – на FRTF (см. рис. 2); боковые цепи ряда остатков активного сайта были повернуты в соответствии с положением их аналогов в структуре PDB ID: 4WTG.

Полученная модельная система была полностью сольватирована молекулами воды; были добавлены ионы натрия и хлора для нейтрализации заряда и обеспечения физиологической концентрации NaCl: 0.15 моль/л. Молекулярно-динамические расчеты проводились с помощью программы NAMD [8], анализ траекторий – в программе

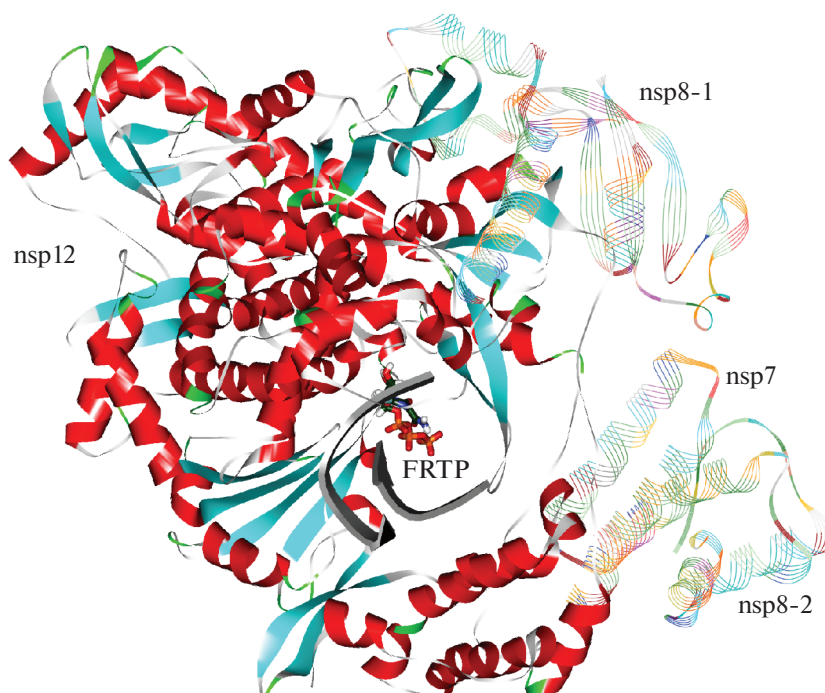


Рис. 3. Общий вид модельной системы без сольватных оболочек.

VMD [9]. Использовались условия ансамбля NTP с периодическими граничными условиями; шаг интегрирования составлял 2 фс, при этом все связи тяжелых атомов с атомами водорода были фиксированы (алгоритмы SHAKE/SETTLE). Потенциалы взаимодействия соответствовали силовому полю CHARMM36 [10]. Нестандартная топология и параметры остатка F RTP были описаны параметрами CGenFF [11]. Длина траекторий составляла не менее 40 нс, кадры траектории записывались через 200 пс.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 3 показан комплекс без сольватирующих оболочек молекул воды. Белки nsp7 и nsp8 важны для поддержания конструкции, но не участвуют в химических преобразованиях.

В центре рис. 3 видны показанные стержнями фосфатные группы молекулы F RTP. Стрелками обозначены цепочки РНК, содержащие гуаниновый (Gua), адениновый (Ade) и урациловый (Ura) нуклеотиды.

Рисунок 4 показывает, насколько стабильна модельная система вдоль молекулярно-динамической траектории. После начального участка (примерно 10 нс) вся конструкция довольно устойчива (рис. 4а). Анализ показывает, что наиболее подвижные участки в nsp12 относятся к петлям вдали от активного центра фермента.

Для уравнивания положения F RTP требуется больше времени — примерно 20 нс. Это объ-

ясняется тем, что молекула F RTP не является нативным субстратом фермента, а также особенностями начального этапа конструирования модельной системы, а именно: группы F RTP замещали другое соединение в кристаллической структуре PDB ID: 4WTG.

На рис. 5 показано, что молекула фавипиравира достаточно удачно входит в комплекс. “Голова” F RTP структурно похожа на аденин и образует пару с ближайшим основанием Gua. На рис. 6 представлена структура активного центра фермента RdRp.

Присоединение фавипиравира к концевому нуклеотиду Ura происходит по химической реакции, показанной на рис. 1. На первом этапе депротонируется группа $O^{3'}H^{3'}$ рибозы урацила, причем очевидным обобщенным основанием является боковая цепь Asp760 — расстояние между атомом кислорода $O^{3'}$ и атомом кислорода карбоксильной группы аспарагиновой кислоты составляет 2.8 Å, обеспечивая эффективный перенос протона. Расстояние от $O^{3'}$ до атома фосфора P^A , равное 3.3 Å, также благоприятствует нуклеофильной атаке с образованием связи $O^{3'}-P^A$ и разрывом связи P^A-O^{3A} . На рис. 6 не показаны боковые цепи аминокислотных остатков Asp761 и Asp618, входящих в координационные сферы ионов магния, а также положительно заряженные остатки Arg553, Arg555 и Lys551, которые связывают и ориентируют трифосфатный участок молекулы F RTP.

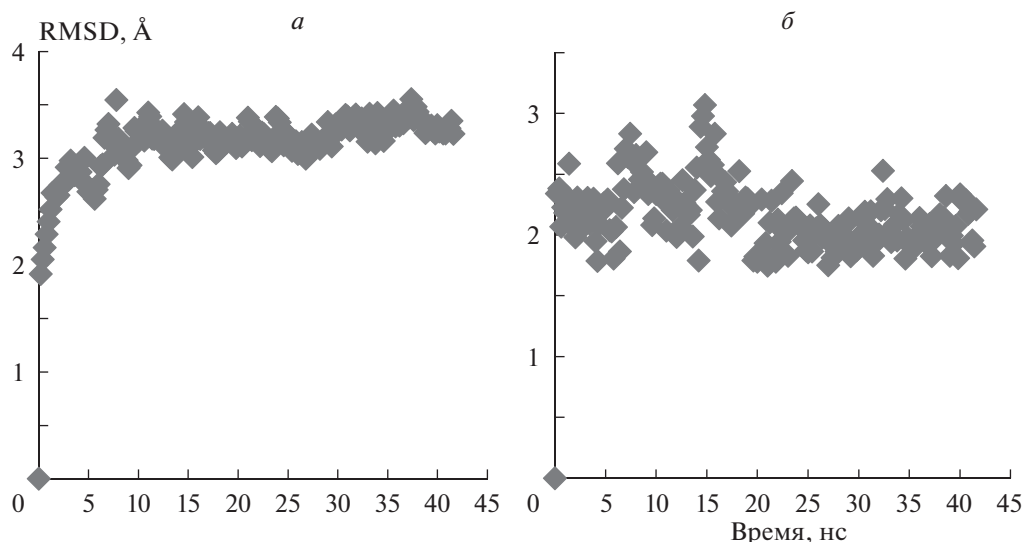


Рис. 4. Среднеквадратичные отклонения координат (RMSD) тяжелых атомов белка (а) и молекулы F RTP (б).

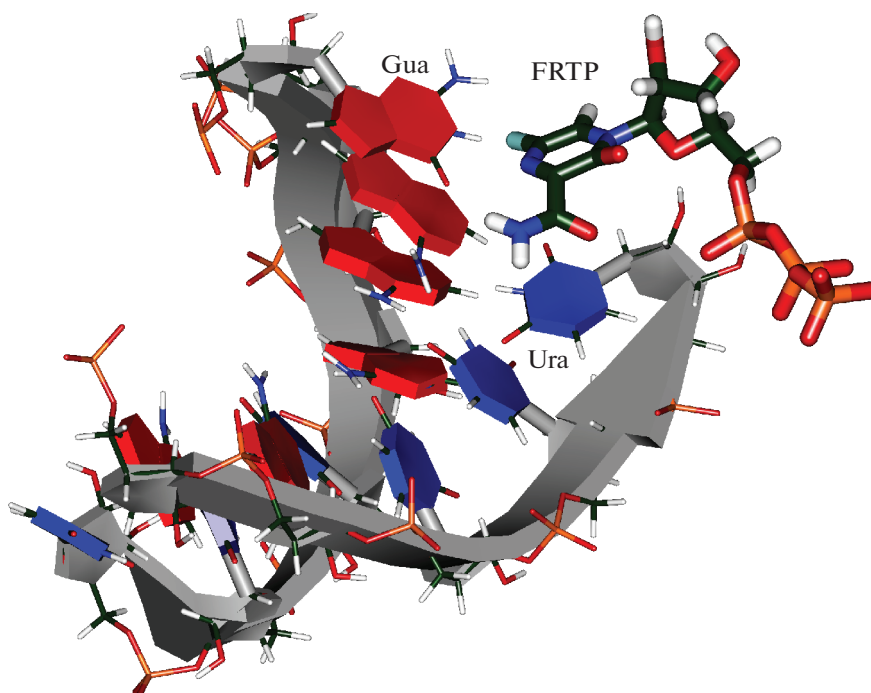


Рис. 5. Цепочки РНК и фавипиравир в комплексе.

Настоящая работа подтверждает современные достижения компьютерного моделирования биомолекулярных процессов [12, 13]. В данном случае построенный активный центр фермента полностью согласуется с представлениями о каталитических процессах с участием нуклеозидтрифосфатов. Похожий активный центр формируется в случае фермента аденилатциклазы, катализирующего реакцию преобразования аденозинтрифосфата в циклический аденозинмонофосфат. Элементарные стадии этого процесса также включают депротонирова-

ние $O^{3'}H^{3'}$ -группы рибозы, нуклеофильную атаку $O^{3'}$ на атом фосфора P^A α -фосфатной группы нуклеозидтрифосфата и разрыв связи P^A-O^{3A} . Недавние расчеты комбинированным методом квантовой механики/молекулярной механики [6] показали, что энергетический профиль этой реакции имеет барьер для лимитирующей стадии порядка 16 ккал/моль. Мы ожидаем, что в случае реакции РНК-полимеразы SARS-CoV-2 с F RTP энергетический профиль будет аналогичным, что согласуется с эффективным встраиванием фавипиравира

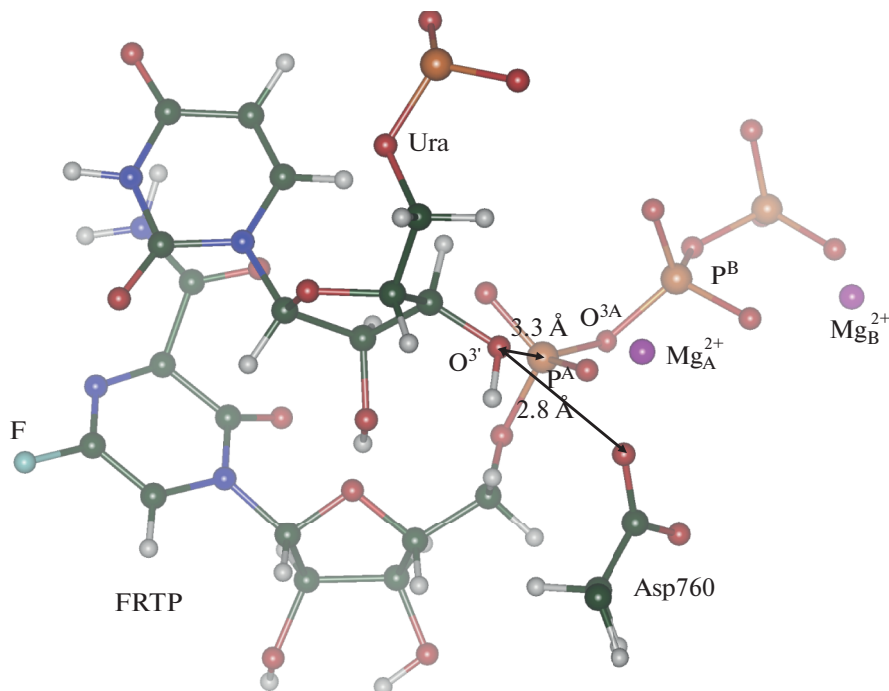


Рис. 6. Молекулярные группы в активном центре РНК-полимеразы с фавипиравиром.

в цепочку РНК. Блокада синтеза РНК после захвата этого соединения, по всей видимости, связана с нарушением структуры формирующейся цепочки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Построенная методами молекулярного моделирования модель многомолекулярного комплекса РНК-полимеразы коронавируса SARS-CoV-2 объясняет механизм воздействия фавипиравира на процесс репликации. Анализ полученной структуры и активного центра фермента показывает, что фавипиравир в форме рибозатрифосфата может встраиваться в комплекс nsr12–nsr7–nsr8 с цепочками РНК и конкурировать с природными нуклеотидами в реакции наращивания цепи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 19-03-00076) с использованием оборудования Межведомственного суперкомпьютерного центра РАН и Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ им. М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Venkataraman S., Prasad B.V.L.S., Selvarajan R. // *Viruses*. 2018. V. 10. P. 76; <https://doi.org/10.3390/v10020076>
2. Furuta Y., Gowen B. B., Takanashi K. et al. // *Antiviral Res.* 2013. V. 100. P. 446; <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.015>
3. Gao Y., Yan L., Huang Y. et al. // *Science*. 2020. V. 368. P. 779; <https://doi.org/10.1126/science.abb7498>
4. Appleby T.C., Perry J.K., Murakami E. et al. // *Ibid.* 2013. V. 347. P. 771; <https://doi.org/10.1126/science.1259210>
5. Wang B., Feig M., Cukier R.I. et al. // *Chem. Rev.* 2013. V. 113. P. 8546; <https://doi.org/10.1021/cr400046x>
6. Grigorenko B., Polyakov I., Nemukhin A. // *J. Phys. Chem. B*. 2019. V. 124. P. 451; <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b07349>
7. Grigorenko B.L., Kots E.D., Nemukhin A.V. // *Org. Biol. Chem.* 2019. V. 17. P. 4879; <https://doi.org/10.1039/c9ob00463g>
8. Phillips J.C., Braun R., Wang W. et al. // *J. Comp. Chem.* 2005. V. 26. P. 1781; <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>
9. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *J. Molec. Graphics*. 1996. V. 14. P. 33; [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
10. Best R.B., Zhu X., Shim J. et al. // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. V. 8. P. 3257; <https://doi.org/10.1021/ct300400x>
11. Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C. et al. // *J. Comput. Chem.* 2010. V. 31. P. 671; <https://doi.org/10.1002/jcc.21367>
12. Григоренко Б.Л., Хренова М.Г., Кулакова А.М. и др. // *Хим. физика*. 2020. Т. 39. № 6. С. 13; <https://doi.org/10.31857/S0207401X20060023>
13. Метелешко Ю.И., Немухин А.В., Хренова М.Г. // *Хим. физика*. 2019. Т. 38. № 6. С. 3; <https://doi.org/10.1134/S0207401X19060074>