

Аннотация работы:

Данное исследование направлено на создание мутантных вариантов протективного антитела против вируса клещевого энцефалита, которые бы обладали повышенной эффективностью по отношению к штаммам Европейского и Сибирского субтипов ВКЭ. Для этого были использованы методы рационального дизайна белковых молекул в комбинации с классическими методами генетической и белковой инженерии. За отчетный период была исследована возможность стабилизации комплекса «антитело-антиген» за счет введения мутаций, приводящих к формированию дополнительных ионных связей («солевых мостиков») между белковыми молекулами. Моделирование *in silico* показало стабильность образующихся связей, однако экспериментальная проверка на рекомбинантных белках показала отсутствие повышения аффинности таких вариантов антитела к вирусному белку.

Тема исследования: «Моделирование *in silico* эффекта от введения мутаций в антиген-связывающую область антитела против вируса клещевого энцефалита»

Состав коллектива:

1. Байков Иван Константинович, возраст 36 лет, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН), старший научный сотрудник, к.х.н., ivan_baykov@mail.ru. Является также ассистентом преподавателя кафедры ХТТ ФЕН НГУ.
2. Михайлова Екатерина Евгеньевна, 4й курс ФЕН НГУ, кафедра молекулярной биологии. Дипломная работа. Обучение (бакалавриат) заканчивается в июне 2023.

Информация о финансировании: исследование в отчетный период не финансировалось фондами.

Научное содержание работы**1. Постановка задачи:**

Создание эффективных противовирусных антител является одним из важных направлений современной белковой инженерии. Ранее в рамках проекта РНФ «Структурный дизайн антител широкой специфичности против вируса клещевого энцефалита» (проект РНФ 19-74-00107, лето 2019 - лето 2021) были разработаны и исследованы мутантные варианты антитела 14D5, обладающие увеличенным (по сравнению с исходным антителом) сродством к сибирскому и европейскому вариантам домена D3 гликопротеина E вируса клещевого энцефалита (ВКЭ). В настоящий момент проект РНФ успешно закончен, однако осталась часть задач, требующих постановки вычислительных экспериментов.

Ионные взаимодействия играют важную роль в белок-белковых взаимодействиях, в том числе и при взаимодействии антител с антигенами (Yoshida K et al., *Sci Rep.* 2019). Одним из подходов, используемых для повышения аффинности между антителом и узнаваемым антигеном, является введение в антитело мутаций, которые стабилизируют комплекс либо за счет дополнительных солевых мостиков, либо за счет усиления дальнедействующих электростатических взаимодействий (Fukunaga A et al., *Protein Engineering, Design and Selection* 2013; Kiyoshi M et al, *PLoS One* 2014; Baran D et al., *PNAS* 2017). Данный подход был применен для повышения сродства антитела 14D5 к белкам D3 гликопротеина E ВКЭ.

Цель вычислительной части проекта за отчетный этап – методами молекулярной динамики оценить стабильность ионных связей, которые образуются при введении некоторых мутаций в антитело.

Те варианты антитела, для которых было показано формирование стабильных ионных связей, были получены в виде белков и исследованы биохимическими методами. Был сделан вывод о том, насколько подобные дополнительные связи способствуют увеличению сродства антитела к антигену.

2. Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы

Мутантные варианты антитела были разработаны в результате анализа пространственной структуры комплекса Fab-фрагмента антитела 14D5 с фрагментом D3_Sof вирусного гликопротеина E ВКЭ (Baykov IK et al, 2021, bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.07.28.453943>) (рис. 1). Анализ структуры комплекса выявил несколько положений на поверхности антитела, введение заряженных остатков в которые могло бы усилить электростатическое взаимодействие между антителом и белком D3 (табл 1). Для оценки стабильности солевых мостиков, образующихся в результате введения соответствующих мутаций, а также их склонности к спонтанному образованию, была проведена серия молекулярно-динамических экспериментов. Для этого предварительно с помощью UCSF Chimera были построены модели комплекса Fv-фрагмента антитела 14D5 с белком D3_Sof, содержащие ту или иную мутацию в молекуле антитела. Аминокислотные остатки, которые предположительно должны образовывать солевой мостик, предварительно отдаляли друг от друга в пространстве выбором подходящей конформации боковых цепей. Симуляцию молекулярной динамики осуществляли в пакете GROMACS 2020.3 на ресурсах Информационно-вычислительного центра Новосибирского государственного университета (ИВЦ НГУ) с использованием ускорителей Nvidia Tesla V100. Белковый комплекс «помещали» в растворитель (100 мМ водный раствор NaCl), проводили минимизацию энергии, уравнивание при температуре 300К. Основную стадию симуляции выполняли в течение 25 нс для каждого комплекса с использованием силового поля Amber ff99SB. Траектории были проанализированы в программе VMD. Считали, что два аминокислотных остатка образуют ионную связь, если расстояние между атомом кислорода карбоксильной группы и атомом азота аминогруппы лизина составляло не более 4.0 Å (Barlow DJ et al., J Mol Biol. 1983; Donald JE et al., Proteins 2011).

Фактический эффект от введения мутаций был исследован на рекомбинантных белках. В качестве модельных вирусных белков, выполняющих роль антигенов, в данном проекте использованы белки D3_Sof, D3_Zau и D3_Eu, которые представляют собой полученные в бактериях E.coli D3-домены гликопротеина E вируса клещевого энцефалита Дальневосточного, Сибирского и Европейского субтипов, соответственно. Сродство мутантных вариантов антитела к белкам D3_Sof и D3_Eu было установлено экспериментально с использованием биосенсора ProteOn XPR 36, использующем явление поверхностного плазмонного резонанса (табл. 1).

3. Полученные результаты

В молекулярно-динамических экспериментах было исследовано формирование ионных связей, а также стабильность этих связей, для пяти мутантных вариантов одноцепочечного антитела sc14D5, содержащих одну из перечисленных мутаций:

L_Tyr50Asp, L_Gly92Glu, H_Asn31Lys, H_Tyr32Lys, H_Trp33Lys (индекс L или H указывает на принадлежность к легкой или тяжелой цепи антитела, далее буквами указаны однобуквенные коды для исходного и мутантного аминокислотных остатков). В результате проведенных молекулярно-динамических было показано, что ионные связи “L_Glu92 – D3_Lys336”, “H_Lys31 – D3_Glu387” и “H_Lys33 – D3_Asp308” (указаны номера участвующих аминокислотных остатков) оказались достаточно стабильными, т. к. соответствующие аминокислотные остатки спонтанно формировали ионную связь и находились вблизи друг друга более 50% времени в течение симуляции. В случае мутации L_Y50D солевой мостик оказался нестабильным, т.к. остаток L_Asp50 предпочтительно образовывал солевой мостик не с остатком D3_Lys315 домена D3, а с остатком L_Arg53 легкой цепи антитела. После замены заряженного остатка L_Arg53 на нейтральный остаток глутамина стабильность солевого мостика существенно возросла, а карбоксильная группа остатка L_Asp50 и аминогруппа остатка D3_Lys315 находились вблизи друг друга более 30% времени в течение симуляции. Поэтому в данном случае для образования относительно стабильного солевого мостика было необходимо введение двух мутаций в ген антитела (соответствующий вариант антитела обозначен scY50D_R53Q).

Наконец, в случае мутации H_Tyr32Lys солевой мостик оказался нестабильным, т.к. остаток D3_Glu387 белка D3 во время молекулярно-динамических экспериментов предпочитал образовывать солевой мостик с остатком D3_Lys309 того же белка. Поэтому данный мутантный вариант (scY32K) одноцепочечного антитела был использован в качестве отрицательного контроля, для которого не должно было произойти усиления связывания с белками D3.

Предполагаемый вклад дополнительных ионных связей был проверен в биохимических экспериментах на рекомбинантных белках. Соответствующие мутантные варианты были получены в бактериях *E. coli*, их сродство по отношению к белку D3_Sof (рекомбинантный домен гликопротеина E ВКЭ) было исследовано с помощью биосенсора ProteOn XPR36. В результате оказалось, что из пяти исследованных вариантов только антитела G92E и N31K были способны связываться с белками D3 (табл. 1), хоть и несколько хуже, чем исходное антитело. Таким образом, введение мутаций, создающих дополнительные солевые мостики между антителом и белком D3, в случае антитела sc14D5 не привело к положительному эффекту. Такой результат, видимо, объясняется тем, что солевые мостики, образуемые на периферии интерфейса, дают некоторый выигрыш в энтальпии взаимодействия, но при этом также дают более заметный проигрыш в энтропии. Например, неоднократно описаны случаи, когда введение мутаций, приводящих к образованию солевых мостиков на поверхности белка, приводит к дестабилизации структуры белка (Sun DP et al., *Biochemistry* 1991; Storp P et al., *Biochemistry* 2000; Takano K et al., *Biochemistry* 2000). В данном случае подобный эффект может наблюдаться для комплекса «антиген-антитело».

Таким образом, в данном исследовании было показано, что введение незначительного числа дополнительных солевых мостиков в случае одноцепочечного антитела sc14D5 не приводит к стабилизации комплекса, и лучше для этого использовать другие подходы, такие как, оптимизация интерфейса «антиген-антитело» (что было сделано на предыдущей стадии исследования).

Иллюстрации:

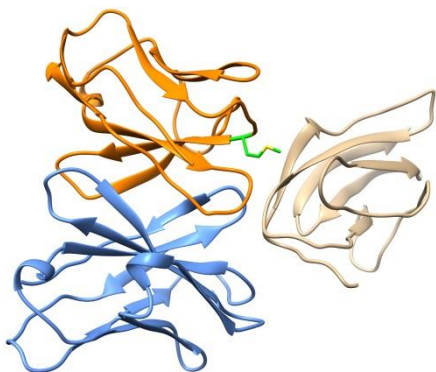


Рис. 1. Пространственная структура комплекса фрагмента антитела с вирусным белком D3_Sof. Оранжевым и синим показаны VL и VH-домены одноцепочечного антитела, бежевым – белок D3_Sof (фрагмент вирусного гликопротеина).

Таблица 1. Мутантные варианты антител, использованные в экспериментах.

Название антитела	Мутация	Kd (D3_Sof)	Kd (D3_Zau)	Kd (D3_Eu)
scY50D_R53Q	L_Tyr50Asp L_Arg53Gln	–	–	–
scG92E	L_Gly92Glu	+	2.9±0.2 мкМ	> 6 мкМ
scN31K	H_Asn31Lys	+	+	+
scY32K	H_Tyr32Lys	–	–	–
scW33K	H_Trp33Lys	–	–	–

“–” значимого связывания не обнаружено; “+” связывание есть, но значения равновесной константы диссоциации не удалось вычислить.

Публикации/конференции:

1. Устный доклад «**Структурный дизайн антитела против вируса клещевого энцефалита с целью расширения его специфичности**» на Школе молодых ученых «Применение синхротронного излучения для решения задач биологии» (11-13 мая 2022 г, г. Новосибирск). В докладе присутствует ссылка на то, что исследования выполнены с использованием ИВЦ НГУ.
2. Устный доклад «**Структурный дизайн антитела против вируса клещевого энцефалита с целью расширения его специфичности**» на школе-конференции "Геномные технологии в получении вирус-нейтрализующих антител" (09 сентября 2022). В докладе присутствует ссылка на то, что исследования выполнены с использованием ИВЦ НГУ.

Эффект от использования кластера в достижении целей работы:

Использование кластера позволило реализовать вычислительную часть исследования и показать, какие из предложенных ионных связей теоретически являются стабильными, отобрать теоретически «успешные» мутантные варианты. Кроме того, это позволило в одном случае увидеть необходимость введения дополнительной мутации (в случае мутантного варианта scY50D_R53Q).