



*На правах рукописи*

**ЗАБРОДСКАЯ**

**Яна Александровна**

**СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ  
N-КОНЦЕВОГО ПЕПТИДА СУБЪЕДИНИЦЫ РВ1 ПОЛИМЕРАЗЫ  
ВИРУСА ГРИППА А**

03.01.02 – Биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

**Егоров Владимир Валерьевич**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории системной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России

**Официальные оппоненты:**

**Шайтан Константин Вольдемарович**, профессор, доктор физико-математических наук, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Рубель Александр Анатольевич**, кандидат биологических наук, заместитель руководителя лаборатории биологии амилоидов ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук

Защита состоится « 18 » июня 2018 года в 14:00 на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» по адресу: 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина 11, корп.1, кафедра «Медицинская физика».

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого по адресу: 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая 29 и на сайте ФГАОУ ВО «СПбПУ» [www.spbstu.ru](http://www.spbstu.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 года.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Линькова Наталья Сергеевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Белок-белковые взаимодействия (ББВ) лежат в основе большей части биологических процессов как нормальных, так и патологических, в связи с чем они рассматриваются как мишени для воздействия лекарственных препаратов [Protein-Protein Interactions: Methods and Applications, 2015]. В качестве одного из наиболее специфичных агентов, способных модулировать ББВ, рассматриваются пептиды или их химические модификации [Fosgerau, Hoffmann, 2015]. Для всесторонней оценки специфичности и механизмов взаимодействия важно использовать широкий спектр адекватных биофизических методов.

В настоящее время пептиды-модуляторы ББВ рассматриваются и в качестве потенциальных противовирусных препаратов. Задача терапии гриппа не теряет своей актуальности, несмотря на интенсивные исследования в области создания профилактических и лечебных препаратов. Ежегодные эпидемии, вызванные постоянно изменяющимися штаммами вируса гриппа, приобретающими устойчивость к существующим противовирусным препаратам, стимулируют исследования, направленные на разработку новых лекарственных средств. Перспективной мишенью для разработки новых противовирусных препаратов, является полимеразный комплекс вируса гриппа ввиду достаточной консервативности его первичной структуры. Одним из структурных элементов, критических для функционирования полимеразного комплекса, является контакт между субъединицами PA и PB1. Модулирование данного межсубъединичного взаимодействия способно привести к разобщению полимеразного комплекса и, как следствие, к ингибированию репликации вируса гриппа. В литературе представлен ряд пептидов-кандидатов, способных воздействовать на указанную область, однако, ни один из них до сих пор не применяется в клинической практике.

Данное исследование посвящено определению структурных основ механизма противовирусного действия пептида из N-концевого участка субъединицы PB1 (PB1<sub>N</sub>) полимеразного комплекса вируса гриппа А с применением адекватных биофизических и биохимических методов, продиктованных особенностями исследуемого объекта, а именно способности изучаемого пептида к индукции конформационного перехода в этом же домене. Согласно «Руководству по проведению доклинических испытаний лекарственных средств» изучение механизма действия является неотъемлемым этапом разработки препаратов [Мионов, Бунатян, 2012]. Это обуславливает актуальность установления механизмов действия противовирусного препарата пептидной природы.

**Степень разработанности темы исследования.** Полимеразный комплекс вируса гриппа является перспективной мишенью для разработки противовирусных препаратов. В настоящее время единственным препаратом, ингибирующим активность полимеразного комплекса, разрешённым к применению в некоторых странах, является Фавипиравир. В то же время, известен ряд экспериментальных пептидов, действующих по конкурентному механизму, для которых показана противовирусная активность на модели клеточных культур [Ghanem и др., 2007; Wunderlich и др., 2009; Wunderlich и др., 2011], однако, в настоящее время ни один из этих пептидов не был разрешён для клинического применения. В работе [Matusevich и др., 2015] была также показана противовирусная активность на модели клеточных культур ряда пептидов из N-концевого участка субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса гриппа А человека. Однако механизм действия этих пептидов оставался невыясненным.

Данное исследование, проведённое с применением обширного арсенала современных

биофизических методов, позволило установить механизм действия пептида из N-концевого участка субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса гриппа А человека, отличный от предложенных ранее в [Ghanem и др., 2007; Wunderlich и др., 2009; Wunderlich и др., 2011].

**Цели и задачи.** *Целью* данной работы являлось определение структурных основ противовирусного действия пептида из N-концевого участка субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса гриппа А.

Для реализации данной цели были поставлены следующие *задачи*:

1. С использованием компьютерного моделирования полноразмерного гетеротримера полимеразного комплекса вируса гриппа А человека обосновать выбор модельной пептидной системы для изучения взаимодействия N-концевого участка субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса гриппа А и пептидов PB1<sub>6-13</sub> и PB1<sub>6-14</sub>.

2. Определить структурные и кинетические параметры взаимодействия пептидов PB1<sub>6-13</sub> и PB1<sub>6-14</sub> с N-концевым участком субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса гриппа А на модельной пептидной системе, применяя адекватные методы изучения белок-белковых взаимодействий в растворе с учётом специфики изучаемых объектов.

3. Идентифицировать белки вируса гриппа, способные к специфическому взаимодействию с пептидами PB1<sub>6-13</sub> и PB1<sub>6-14</sub> *in vitro*, и охарактеризовать изменение структурных характеристик выявленных белков под воздействием пептидов.

4. Определить возможность взаимодействия модифицированного пептида PB1<sub>6-14</sub> и модельного белка, содержащего N-концевой участок субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса гриппа А, на модели клеточных культур.

5. Определить влияние коротких пептидов на размножение вируса гриппа *in vivo* для оценки перспективы дальнейшей разработки лекарственного средства на основе модифицированного пептида PB1<sub>6-14</sub>.

**Научная новизна.** В ходе выполнения данной работы впервые была получена модель гетеротримера полимеразного комплекса вируса гриппа А человека методом молекулярной динамики.

На основании полученных данных впервые была разработана модельная пептидная система, в которой с использованием комплекса биофизических методов были охарактеризованы *in vitro* структурные и кинетические параметры взаимодействия исследуемого пептида с его потенциальной мишенью – N-концевым фрагментом субъединицы PB1 полимеразы вируса гриппа.

В совокупности с результатами, полученными на модели клеточных культур, впервые была подтверждена гипотеза о механизме действия исследуемых пептидов, альтернативная предложенным в литературе.

Возможность реализации принципиально нового механизма действия, а именно индукции конформационного перехода в N-концевом участке субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса гриппа А под действием пептида-фрагмента этого же участка, приводящей к разобщению комплекса и ингибирующей его активность, впервые показана для противовирусных препаратов пептидной природы.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Теоретическая значимость работы обусловлена важностью разработанного методического подхода, включающего в себя создание модельной пептидной системы и применение совокупности биофизических методов, направленных на изучение белок-белковых взаимодействий, приводящих к конформационным

переходам. В данной работе показана принципиальная возможность влияния пептида, соответствующего по первичной структуре фрагменту белка, на его функции.

Обоснование возможности применения *in vivo* и перспектива дальнейшей разработки противовирусного препарата на основе исследуемого пептида с учётом структурных особенностей его действия определяет практическую значимость работы.

**Методология и методы исследования.** В данной работе был использован комплекс биофизических и биохимических методов для изучения ББВ, приводящих к конформационным переходам и агрегации белков, а именно: моделирование молекулярной динамики, MALDI масс-спектрометрическая идентификация белков, круговой дихроизм, лазерная корреляционная спектроскопия, электронная микроскопия, оптическая спектроскопия с применением красителя Конго красный, поверхностный плазмонный резонанс, микромасштабный термофорез, времяразрешённое малоугловое рентгеновское рассеяние с последующей обработкой набора спектров с использованием метода сингулярного разложения, аффинная хроматография в объёме, электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле, вестерн блоттинг, выделение рибонуклеопротеинового комплекса вируса гриппа, атомно-силовая микроскопия, конфокальная микроскопия, малоугловое рассеяние нейтронов, обращённо-фазная хроматография, определение противовирусной активности на модели клеточных культур и *in vitro*. Структурные основы противовирусного действия исследуемого пептида были исследованы на всех возможных уровнях: *in silico*, *in vitro* и на модели клеточных культур, в результате чего *in vivo* была показана перспектива дальнейшей разработки исследуемого пептида в качестве потенциального противовирусного препарата.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Пептиды PB1<sub>6-13</sub> и PB1<sub>6-14</sub> способны вызывать амилоидоподобную агрегацию N-концевого участка субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса гриппа А в модельной пептидной системе.

2. Пептиды PB1<sub>6-13</sub> и PB1<sub>6-14</sub> способны вызывать специфическую агрегацию рибонуклеопротеинового комплекса *in vitro* и N-концевого участка субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса гриппа А в составе модельного белка слияния с зелёным флуоресцентным белком на модели клеточных культур.

3. Модифицированный пептид PB1<sub>6-14</sub> в модели гриппозной инфекции *in vivo* снижает титр вируса гриппа А/California/07/09 (H1N1pdm) в лёгких мышей при применении в оптимальных концентрациях и растворителе, выбранных на основании экспериментов *in vitro*.

**Личный вклад автора** состоит в самостоятельном планировании всех экспериментов и анализе результатов, а также в проведении экспериментов по MALDI масс-спектрометрии, оптической спектроскопии, хроматографии в объёме, ЭФ в ПААГ, вестерн блоттингу, выделению ВРНП и атомно-силовой микроскопии. Совместно с операторами приборов автор проводил эксперименты по лазерной корреляционной спектроскопии, электронной микроскопии, поверхностному плазмонному резонансу, микромасштабному термофорезу, времяразрешённому малоугловому рентгеновскому рассеянию и его математической обработке, малоугловому рассеянию нейтронов.

**Вклад соавторов** состоит в проведении экспериментов по моделированию молекулярной динамики, круговому дихроизму, конфокальной микроскопии, определению противовирусной активности пептидов на модели клеточных культур и *in vivo*; а также в консультировании по получению и анализу результатов малоуглового рентгеновского рассеяния и первичной обработке спектров малоуглового рассеяния нейтронов.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность полученных результатов обусловлена соответствием используемых методов поставленным задачам с учётом особенностей изучаемых объектов, воспроизводимостью результатов и применением методов статистического анализа данных.

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи и 10 тезисов. Результаты доложены на 4 конференциях (2 устных и 2 постерных доклада).

Работа поддержана 4 грантами (в том числе 2 гранта на измерения на источниках нейтронов и синхротронного излучения):

1. Грант РФФИ №14-24-01103 офи\_м «Метод структурно-динамической диагностики нуклеопротеидных мультимолекулярных комплексов в растворе, путем верификации структур, полученных методами молекулярной динамики, в спектрах малоуглового рентгеновского и нейтронного рассеяния» (2014-2016 гг.)

2. «Доклинические исследования противовирусного препарата пептидной природы, подавляющего репликацию вирусов гриппа человека А (H1N1)». ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», ГК №14.N08.11.0080, 2016-2018 гг.

3. Эксперимент #LS-2508, экспериментальная станция @ID02 (1-3 июля 2016 г.), «Mechanisms of peptide-peptide interaction in model system for pb1 subunit of influenza polymerase complex», ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Европейский источник синхротронного излучения), Гренобль, Франция (времяразрешённое малоугловое рентгеновское рассеяние)

4. Эксперимент #2017-10-14-18-31-59, инструмент ЮМО (22-24 января 2018 г.), «Antiinfluenza PB1-derived peptide action mechanism», Объединённый институт ядерных исследований, реактор ИБР-2, Дубна, Россия (малоугловое рассеяние нейтронов)

**Объём и структура диссертации.** Диссертация изложена на 106 страницах машинописного текста, включая 7 таблиц и 43 рисунка. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, списка сокращений и списка литературы. Список литературы содержит 106 источников литературы на русском и английском языках. Диссертация соответствует общим требованиям к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утверждённым ГОСТ Р 7.0.11-2011.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Пептиды** были синтезированы на химическом факультете СПбГУ [Матусевич, 2014; Matusевич и др., 2015]. **Антитела** приобретены в компаниях Биалекса, Bio-Rad, а также получены в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. **Плазмиды**, кодирующие белки слияния PB1<sub>6-25</sub>-GFP и GFP, были сконструированы, накоплены и очищены в НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ (А.Е. Шмидт). **Рекомбинантный нуклеопротеин**, содержащий полигистидиновый тэг, был получен и очищен в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. **Клетки и вирусы.** Вирус гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm) для заражения клеток и накопления на куриных эмбрионах, аналогичный вирус, адаптированный к мышам, а также клетки МДСК были получены из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. **Животные.** Для определения противовирусной активности пептида *in vivo* были использованы мыши линии Balb/c (самки) массой 20-22 г (возраст 8-10 недель).

**Моделирование молекулярной динамики** гетеротримера полимеразного комплекса вируса гриппа А человека выполнялось в НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ (к.ф.-м.н., А.В. Швецов) с использованием вычислительного центра СПбГПУ им. Петра Великого, в программном пакете GROMACS 2016.1 [Abraham и др., 2015] на основе структуры полимеразного комплекса вируса гриппа летучей мыши 4WSB [Cusack и др., 2014] методом гомологического моделирования.

**Регистрация MALDI масс-спектрометров и спектров фрагментации.** Спектры пептидов были получены в рефлекторном режиме регистрации положительных ионов на MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре UltrafleXtreme, Bruker в присутствии матрицы HCCA, Bruker, и в тандемном режиме для подтверждения их аминокислотной последовательности, идентифицированной с использованием MASCOT (matrixscience.com). Точность определения  $m/z$  родительского иона была ограничена 20 ppm, его фрагментов – 0.2 Да.

**Электронная микроскопия (ЭМ).** Подготовка образцов осуществлялась согласно стандартному протоколу негативного контрастирования 1.5% водным раствором натриевой соли фосфовольфрамовой кислоты. Измерения проводились на электронном микроскопе JEOL JEM 1100 при ускоряющем напряжении 80 кВ.

**Лазерная корреляционная спектроскопия (ЛКС).** Спектры были получены на лазерном корреляционном спектрометре ЛКС-03, Интокс. Обработка спектров была выполнена в программном обеспечении к прибору.

**Круговой дихроизм (КД)** был выполнен в ФГБУН «Институт цитологии» РАН.

**Конго красный (КК)** в концентрации 50  $\mu\text{M}$  в PBS был смешан с пептидом в концентрации 10  $\mu\text{M}$ . Спектры поглощения были зарегистрированы на Avantes Ava Spec 2048.

**Микромасштабный термофорез (MST)** был проведён на установке Monolith NT.115, Nanotemper technologies GmbH, в соответствии с протоколами производителя при 80% интенсивности лазера, 25°C. Были использованы 0.5  $\mu\text{M}$  пептид FITC-PB1<sub>6-14</sub> и диапазон из 16 концентраций пептида PB1<sub>1-25</sub> от 0.012 до 400  $\mu\text{M}$ , растворённого в 10% DMSO/PBS.

**Времяразрешённое малоугловое рентгеновское рассеяние (ВР-МУРР)** было проведено на источнике синхротронного излучения ESRF (Гренобль, Франция) на спектрометре ID02 в соответствии с правилами использования. Мономеры пептидов были растворены в 10% DMSO/PBS и затем смешаны в эквимольном соотношении с помощью системы остановленного потока в конечных концентрациях 0.2 мМ. Через 5 мс после смешивания была начата регистрация спектров МУРР (100 шт.) с интервалами в 3 с. Обработку данных проводили с помощью оригинального программного обеспечения SAX (Н.В. Клопов, НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ), использующего метод сингулярного разложения (SVD) для выявления характерных участков группы спектров ( $U(q)$ ) и изменения таких компонент во времени ( $V(t)$ ). На основе экспоненциальной кинетики основных компонент разложения были рассчитаны спектры МУРР для начального и конечного состояний системы.

**Конфокальная микроскопия.** Клетки MDCK были трансфицированы плазмидами, кодирующими PB1<sub>6-25</sub>-GFP или GFP, в количестве 1000 нг при помощи липофектамина-2000, Thermo. К клеткам, содержащим плазмиды, а также к контрольным клеткам без плазмиды на 1 ч были добавлены среда optiMEM, Thermo (контроль), растворитель пептида (0.25% DMSO/0.25% EtOH), или пептид. В клетки с плазмидами был добавлен пептид Ac-PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub>, а в клетки без плазмиды – FITC-PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub>. Конечная концентрация пептидов составила 30  $\mu\text{M}$ . Клетки были зафиксированы 4% параформальдегидом/PBS, ядра были окрашены DAPI, Thermo. Препараты клеток были заключены в раствор Mounting medium, Sigma, и

проанализированы с помощью лазерного сканирующего микроскопа Leica TSC SP8 с гибридным детектором повышенной чувствительности. Флуоресценция FITC, GFP и DAPI регистрировалась с использованием стандартных параметров.

**Аффинная хроматография.** Иммуобилизация пептида PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub> была проведена на NHS-активированную сефарозу, NHS-activated Sepharose™ 4 Fast Flow, GE Healthcare, согласно инструкции производителя. Белки мягко лизированного вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm) в количестве 400 µг были смешаны со 100 µл инертного носителя, переведенного в 0.5% NP-40/PBS. Инкубация была проведена в течение 30 мин при комнатной температуре, затем инертный носитель был трижды отмыт 0.5% NP-40/PBS, а затем PBS, после чего связавшийся белок был идентифицирован методом масс-спектрометрии.

**Масс-спектрометрическая идентификация белков.** После электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях [Laemmli, 1970] и окрашивания коллоидным раствором Кумасси [Candiano и др., 2004], интересующие зоны белков были вырезаны и подготовлены к масс-спектрометрическому исследованию согласно [Målen и др., 2007], минуя этап восстановления дисульфидных связей и карбамидометилирования. Гидролиз был проведён при 37°C в течение 5 ч. При идентификации белков в растворе после аффинной хроматографии к образцу сразу был добавлен раствор трипсина 20 µг/мл в 100 мМ бикарбонате аммония, после чего реакция была проведена при 60°C в течение 1.5 ч. Масс-спектры полученных триптических пептидов были зарегистрированы и идентифицированы аналогично описанному ранее в присутствии матрицы DHB, Bruker. Погрешность определения массы была ограничена 20 ppm. В качестве переменных модификаций было указано окисление метионинов (M).

**Выделение рибонуклеопротеинового комплекса (вРНКП)** было проведено согласно [Wu, Weaver, Panté, 2009].

**Атомно-силовая микроскопия (АСМ).** На свежерасщеплённую подложку из слюды, SPI supplies, было нанесено 10 µл раствора пептида в фосфатном буфере (PBS). После инкубации порядка 1 мин слюда была отмыта трижды водой и высушена. Измерения топографии поверхности образца были проведены на сканирующем зондовом микроскопе SolverNext, NT-MDT, в полуконтактном режиме (зонд NSG-03). Последующая обработка и анализ изображений были проведены в программе Gwyddion [Nečas, Klapeček, 2012].

**Поверхностный плазмонный резонанс (ППР).** Активация сенсорного чипа CM5, GE Healthcare, и иммуобилизация пептида PB1<sub>6-14</sub> была осуществлена на приборе Biacore X100, GE Healthcare в соответствии с инструкцией производителя. Лиганд был иммуобилизован в концентрации 400 µМ в MES, Sigma, pH 6.0, 2% EtOH. Уровень иммуобилизации составил 3100 RU (~0.13 нмоль). Для измерения K<sub>d</sub> были использованы мономеры пептидов PB1<sub>6-14</sub> или PB1<sub>6-25</sub>, растворённых в концентрациях 59, 89, 133, 200 и 300 µМ в 2% EtOH/HEPES. Скорость потока 30 µл/мин, время контакта и диссоциации – 180 с.

Для установления связывания мономера NP и пептида PB1<sub>6-14</sub> был использован чип NTA, куда перед каждым циклом добавления аналита (пептида PB1<sub>6-14</sub> в указанных выше концентрациях) был иммуобилизован NP (2 µмоль) в присутствии ионов никеля.

**Приготовление пептида в различных агрегационных состояниях.** Растворимость пептида оценивали по его концентрации в надосадочной жидкости после центрифугирования при сравнении с аналогичным количеством пептида, растворённого в ацетонитриле, методом обращённо-фазной хроматографии в изократическом режиме разделения (0.1% TFA в воде к 0.1% TFA в ацетонитриле как 68:32). В том случае, если концентрация пептида в надосадочной



жидкости соответствовала концентрации пептида в ацетонитриле, при этом сдвига спектра поглощения специфического красителя КК не происходило, то такое состояние называлось «мономерами», в противном случае – «фибриллами».

**Малоугловое рассеяние нейтронов (МУРН)** было проведено на спектрометре ЮМО, реактор ИБР-2 (лаборатория нейтронной физики ОИЯИ, г. Дубна), в стандартной геометрии, описанной в [Kuklin и др., 2011; Kuklin, Islamov, Gordeliy, 2005]. Регистрация рассеяния осуществлялась двумя детекторами одновременно в области  $q = 0.006-0.3 \text{ \AA}^{-1}$ . Предварительную обработку данных осуществляли по схеме, изложенной в [Soloviev и др., 2017]. Нормировка и получение кривых в абсолютных единицах реализуется с помощью металлического ванадия, находящегося непосредственно перед детектором.

**Определение противовирусной активности пептида на модели клеточных культур** было проведено в отделе этиологии и эпидемиологии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

**Определение противовирусной активности пептида *in vivo*** было проведено в лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. МОДЕЛЬНАЯ ПЕПТИДНАЯ СИСТЕМА

#### 1.1 Моделирование полимеразного комплекса вируса гриппа А человека

Единственная структура полноразмерного полимеразного комплекса вируса гриппа А, опубликованная в настоящее время в литературе, получена методом рентгеноструктурного анализа и относится к вирусу гриппа А летучей мыши (4WSN) [Cusack и др., 2014]. Для уточнения интерфейсов взаимодействия между субъединицами PA и PB1 вируса гриппа А человека было проведено гомологическое моделирование молекулярной динамики гетеротримера полимеразного комплекса. При анализе полученной в результате карты контактов субъединиц можно сделать вывод о том, что первые 37 а.о. N-концевого участка PB1 (PB1<sub>1-37</sub>) взаимодействуют только с C-концевым участком PA (PA<sub>C</sub>), находятся в конформации альфа-спирали и на формирование его структуры никакие другие взаимодействия не влияют.

#### 1.2 Выбор пептидов и обоснование модельной пептидной системы

В работе [Matusevich и др., 2015] была показана противовирусная активность в отношении вируса гриппа А/California/07/09 (H1N1pdm) пептидов-фрагментов PB1<sub>N</sub>, в частности **PB1<sub>6-13</sub>**, **PB1<sub>6-14</sub>** и ряда их химических модификаций (далее – **короткие пептиды**). В рамках [Matusevich, 2014] было проведено компьютерное моделирование PB1<sub>6-25</sub> и показано, что он способен принимать бета-конформацию, в то время как в структуре полимеразного комплекса находится в конформации альфа-спирали. Поскольку PB1<sub>6-25</sub> представляет собой зеркально-симметричный мотив <sup>6</sup>TLLFLKVPQAQNAISTTFPYT<sup>25</sup> (а.о. в симметричных положениях выделены жирным шрифтом), то была высказана гипотеза об их механизме действия: короткие пептиды, являющиеся половиной зеркально-симметричного мотива PB1<sub>6-25</sub>, способны стабилизировать бета-конформацию пептида, содержащего целый мотив [Matusevich, 2014; Egorov и др., 2013]. В настоящей работе гипотеза была расширена и сформулирована как **гипотеза об индукции конформационного перехода в PB1<sub>N</sub> под действием коротких пептидов**. В данной работе были исследованы структурные основы противовирусного действия коротких пептидов.

Проверка выдвинутой гипотезы на первом этапе была проведена на модельной пептидной системе. По результатам моделирования молекулярной динамики, которые полностью согласуются с литературными данными [Chang и др., 2015; He и др., 2008; Pflug и др., 2014], было показано, что как минимум первые 25 а.о. PB1<sub>N</sub> находятся в контакте только с субъединицей PA, и на формирование его структуры взаимодействия с а.о. из других доменов PB1 непосредственно не влияют. В связи с этим в качестве модели изолированного N-концевого домена (PB1<sub>N</sub>) могут выступать его фрагменты: PB1<sub>6-25</sub> и PB1<sub>1-25</sub>.

### 1.3 Характеристика коротких пептидов

Массы всех коротких пептидов были подтверждены методом MALDI масс-спектрометрии, а также для наиболее перспективного пептида Ac-PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub> был зарегистрирован спектр фрагментации в режиме тандемной масс-спектрометрии, что позволило достоверно идентифицировать его как фрагмент белка PB1 вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm), TLLFLKVPA с N-концевым ацетилированием и C-концевым амидированием, Score = 57 (при превышении порогового значения Score = 56 идентификация считается достоверной,  $p < 0.05$ ).

## 2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ И PB1<sub>N</sub> В МОДЕЛЬНОЙ ПЕПТИДНОЙ СИСТЕМЕ

### 2.1 Взаимодействие коротких пептидов и PB1<sub>N</sub> приводит к образованию агрегатов

Методом КД было подтверждено, что пептид PB1<sub>6-25</sub> способен образовывать бета-пишльку (35% пептида находится в бета-конформации), при этом добавление к нему пептида PB1<sub>6-13</sub>, не имеющего характерной вторичной структуры, приводит к увеличению содержания бета-структур в образце (Рисунок 1А). Данные ЭМ и ЛКС (Рисунок 1Б) также указывают на образование крупных агрегатов (500-1000 нм) при смешивании PB1<sub>6-13</sub> и PB1<sub>6-25</sub>, не наблюдаемых в исходных образцах [Egorov и др., 2013].

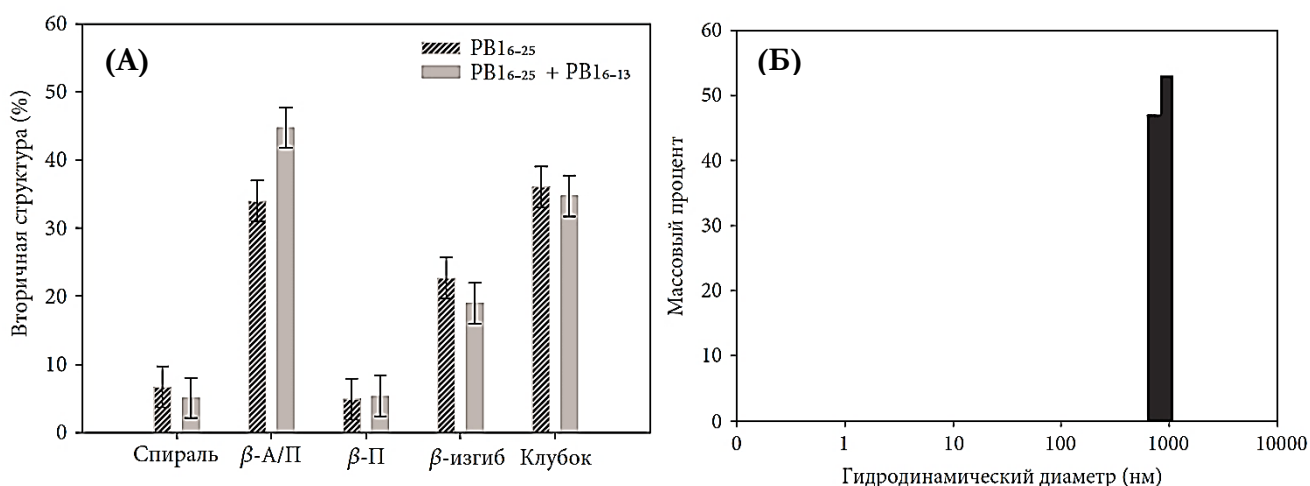


Рисунок 1 – **(А)** Влияние пептида PB1<sub>6-13</sub> на вторичную структуру пептида PB1<sub>6-25</sub>, полученное в результате обработки разностного спектра КД. «Спираль» – альфа-спираль, «β-А/П» – антипараллельная бета-структура, «β-П» – параллельная бета-структура, нерегулярные структуры: «β-изгиб», «Клубок» (неструктурированный пептид). **(Б)** Распределение гидродинамического диаметра частиц в растворе, полученное по данным лазерной корреляционной спектроскопии смеси пептидов (адаптировано из [Egorov и др., 2013])

Природа образующихся при взаимодействии пептидов PB1<sub>6-13</sub> и PB1<sub>6-25</sub> агрегатов была изучена с использованием специфичного красителя КК (Рисунок 2А). Было показано, что агрегаты имеют амилоидоподобную природу.

Таким образом, фрагмент PB1<sub>6-25</sub>, который в составе полимеразного комплекса находится в конформации альфа-спирали способен образовывать бета-структуру *in vitro*. При этом взаимодействие пептида PB1<sub>6-13</sub> с PB1<sub>N</sub> в модельной пептидной системе приводит к образованию крупных амилоидоподобных агрегатов, что указывает на их способность к взаимодействию, приводящую к конформационному переходу в PB1<sub>N</sub>.

## 2.2 Константа взаимодействия PB1<sub>N</sub> и коротких пептидов

Константу взаимодействия мономеров коротких пептидов с PB1<sub>N</sub> в растворе определяли методом микромасштабного терморефа (MST). Зависимость относительной интенсивности флуоресценции ( $F_{\text{norm}}$ ) смеси пептидов FITC-PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub> и PB1<sub>1-25</sub> от различных концентраций анализа представлена на Рисунке 2Б.

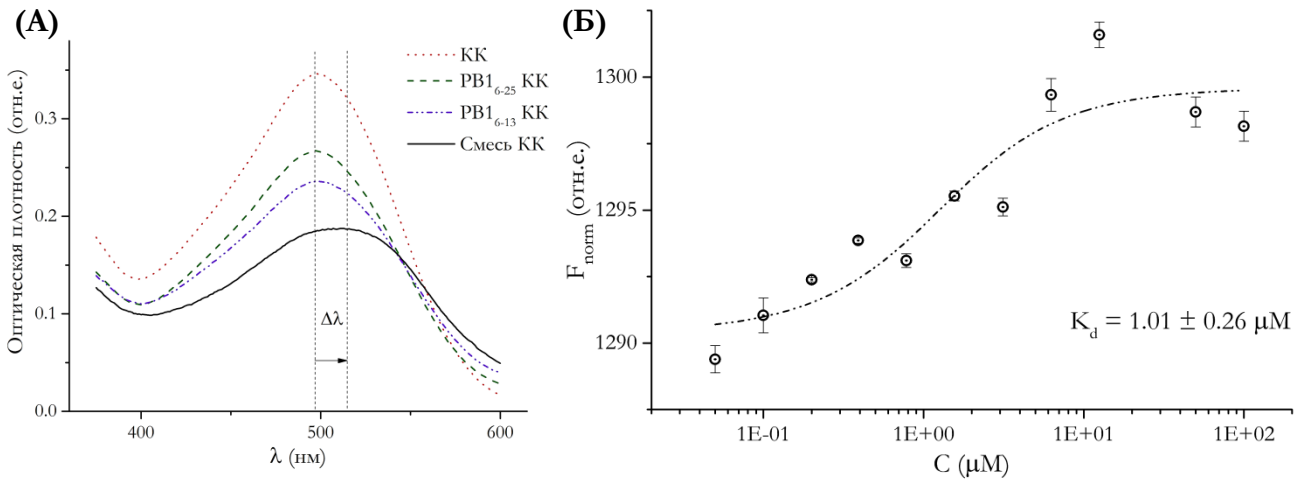


Рисунок 2 – (А) Спектр поглощения КК – красная кривая, мономера пептида PB1<sub>6-13</sub> в присутствии КК – синяя кривая, мономера пептида PB1<sub>6-25</sub> в присутствии КК – зелёная кривая, смесь пептидов в присутствии КК – чёрная кривая. В смеси пептидов наблюдается характерный для бета-структурированных амилоидоподобных агрегатов сдвиг максимума поглощения КК вправо ( $\Delta\lambda$ ). (Б) Зависимость относительной интенсивности флуоресценции смеси пептидов FITC-PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub> и PB1<sub>1-25</sub> от концентрации анализа, полученная методом MST, (адаптировано из [Zabrodskaia и др., 2018])

График зависимости нормированной флуоресценции  $F_{\text{norm}}$  от концентрации лиганда был использован для определения  $K_d$  в соответствии с Формулой 1.

$$F_{\text{norm}}(C) = F_{\text{norm}}(\text{unbound}) + \frac{1}{2} (F_{\text{norm}}(\text{bound}) - F_{\text{norm}}(\text{unbound})) \times (C_{\text{fluor}} + C + K_d - \sqrt{(C_{\text{fluor}} + C + K_d)^2 - 4 \cdot C_{\text{fluor}} \cdot C}), \text{ где} \quad (1)$$

$C_{\text{fluor}}$  – концентрация FITC-PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub>,  $C$  – концентрация PB1<sub>1-25</sub>,  $K_d$  – равновесная константа диссоциации,  $F_{\text{norm}}(\text{bound})$  и  $F_{\text{norm}}(\text{unbound})$  – нормированная флуоресценция в связанном и несвязанном состояниях соответственно.

В экспериментах по MST  $K_d$  составила  $1.01 \pm 0.26 \mu\text{M}$ . Следует отметить, что по литературным данным константа взаимодействия PB1<sub>N</sub> и PAC составила  $1.6 \mu\text{M}$  [Wunderlich и др., 2011]. Это указывает на то, что высказанная нами гипотеза об индукции конформационного перехода в PB1<sub>N</sub> под действием короткого пептида из этого же участка

субъединицы РВ1 и гипотеза о конкурентном механизме действия, высказанная в [Wunderlich и др., 2011], равноправны. В пользу механизма амилоидоподобной передачи конформации, предложенного для исследуемых в данной работе коротких пептидов, говорит также и то, что FITC-меченый и немеченые пептиды обладают сходной противовирусной активностью, показанной на модели клеточных культур [Matusевич и др., 2015], в то время как при осуществлении конкурентного механизма N-концевая FITC-метка препятствовала бы встраиванию пептида в карман РАС для разобнения работы полимеразного комплекса.

### 2.3 Временные параметры образования структур в результате взаимодействия

Характерные времена образования структур в результате взаимодействия мономеров пептидов РВ1<sub>6-13</sub> и РВ1<sub>6-25</sub> были определены методом ВР-МУРР. Набор из 100 спектров МУРР, полученный в течение первых пяти минут после смешивания пептидов, был обработан методом SVD, позволяющим выявить наиболее изменяющиеся области группы спектров (компонента разложения  $U(q)$ ) и определить динамику таких изменений ( $V(t)$ ).

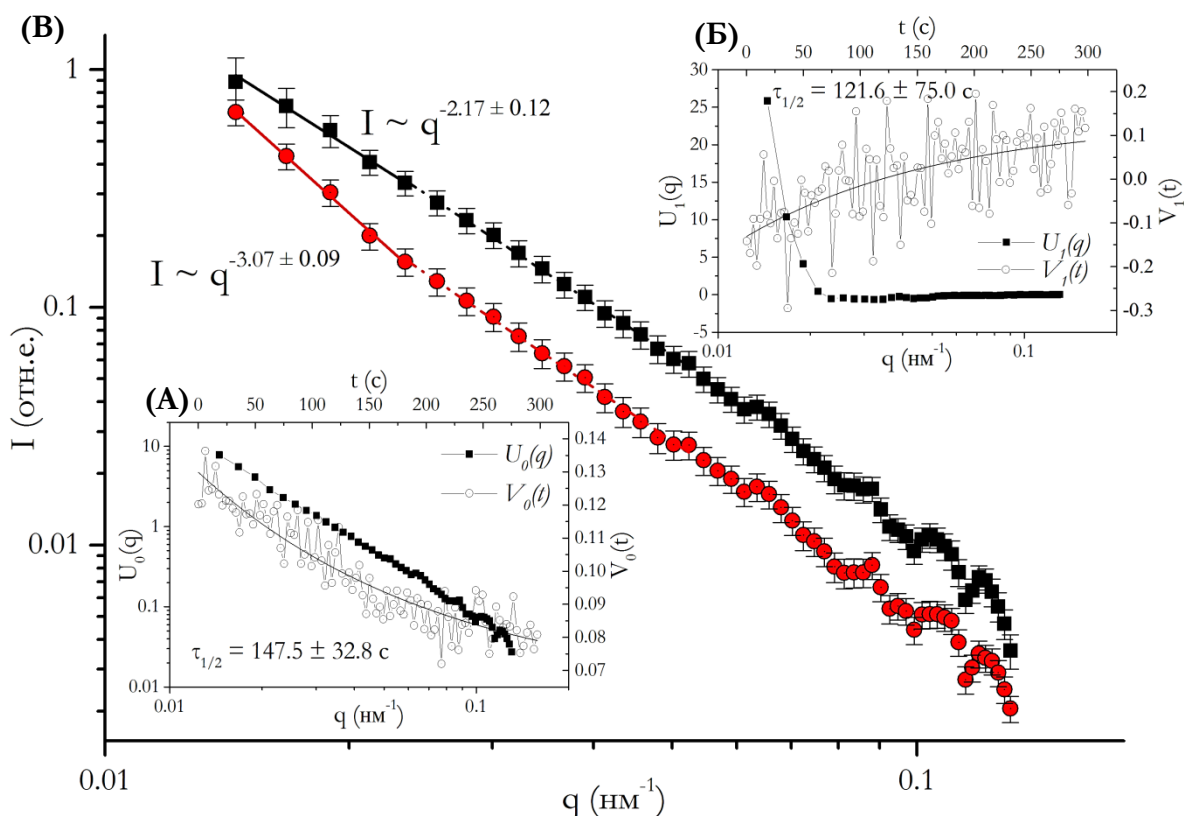


Рисунок 3 – (А)  $U_0(q)$  – Форма нулевой компоненты сингулярного разложения спектров МУРР в диапазоне измерения  $q$  от 0.01 до 0.2  $\text{nm}^{-1}$  на растворе смеси пептидов РВ1<sub>6-13</sub> и РВ1<sub>6-25</sub>;  $V_0(t)$  – изменение нулевой компоненты в зависимости от времени. Характерное время ( $\tau_{1/2}$ , время полупревращения) составило  $147.5 \pm 32.8$  с. (Б)  $U_1(q)$  – Форма первой компоненты сингулярного разложения спектров МУРР в диапазоне измерения  $q$  от 0.01 до 0.2  $\text{nm}^{-1}$  на растворе смеси пептидов РВ1<sub>6-13</sub> и РВ1<sub>6-25</sub>;  $V_1(t)$  – изменение первой компоненты в зависимости от времени. Характерное время ( $\tau_{1/2}$ , время полупревращения) составило  $121.6 \pm 75.0$  с. (В) Спектры МУРР начального ( $t = 0$ ) и конечного ( $t = \infty$ ) состояний системы смеси пептидов РВ1<sub>6-13</sub> и РВ1<sub>6-25</sub>, восстановленные на основании изменения нулевой и первой компонент сингулярного разложения.  $I$  – интенсивность рассеяния (отн.е.),  $q$  – вектор рассеяния ( $\text{nm}^{-1}$ ),  $q = (4\pi \sin\theta)/\lambda$  ( $2\theta$  – угол рассеяния) (адаптировано из [Zabrodskaia и др., 2018])

Форма и динамика наиболее изменяющихся компонент разложения в диапазоне измерения  $q$  от 0.01 до 0.2 нм<sup>-1</sup> на растворе смеси пептидов PB1<sub>6-13</sub> и PB1<sub>6-25</sub> представлена на Рисунке 3А и 3Б, восстановленные начальное и конечное состояния системы представлены на Рисунке 3В. Изменение компонент во времени  $V(t)$  было приближено экспоненциальным уравнением вида  $y = Ae^{-x/t_1} + y_0$ , причём константа скорости  $k = 1/t_1$ , а характерное время полупревращения  $\tau_{1/2} = \ln 2/k$ . Восстановленные на основе метода SVD зависимости интенсивности  $I$  от вектора рассеяния  $q$  были построены в логарифмических координатах и аппроксимированы методом наименьших квадратов степенной функцией  $I \sim q^A$  ( $R^2 = 0.99$ ).

Изменение нулевой компоненты сингулярного разложения, по-видимому, связано с падением интенсивности кривых, что может свидетельствовать о быстрой агрегации пептидов при смешивании, что соответствует полученным нами ранее данным. В то же время в образцах, содержащих пептиды с буфером, подобных изменений не происходит. Изменение первой компоненты, по-видимому, отражает изменение наклона начальных участков кривых ( $A$  изменяется с -2 до -3) с характерным временем около 120 с, что можно интерпретировать как появление крупных агрегатов в образце в результате взаимодействия пептидов.

### 3. ПОИСК ПАРТНЁРА СРЕДИ ВИРУСНЫХ БЕЛКОВ *IN VITRO*

#### 3.1 Связывание вирусных белков с коротким пептидом *in vitro*

Связывание пептида PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub> и вирусных белков изучалось при помощи аффинной хроматографии в объёме. К пептиду, предварительно иммобилизованному на инертный носитель, был добавлен лизированный в присутствии NP-40 вирус гриппа. Методом масс-спектрометрии был достоверно идентифицирован связавшийся с пептидом нуклеопротеин (NP) вируса гриппа А (Score составил 137 при пороговом значении 76; в случае, если Score превышает пороговое значение, идентификация считается достоверной,  $p < 0.05$ ). Поскольку в условиях данного эксперимента показано, что NP находится в составе рибонуклеопротеинового комплекса вируса гриппа (вРНП) [Chase, Schwemmler, 2012], где помимо него присутствует и полимеразный комплекс вируса гриппа, то можно заключить, что из всех вирусных белков пептид специфично взаимодействует с одним из компонентов вРНП.

#### 3.2 Связывание короткого пептида и рибонуклеопротеина вируса гриппа А

Вирусные белки и пептид Ac-PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub> были смешаны и проанализированы методами ЭФ в ПААГ. Было показано, что в образцах, содержащих пептиды, количество NP снизилось примерно в два раза (на  $53 \pm 11\%$ ), снижение содержания NP, а также белков полимеразного комплекса полуколичественно было подтверждено методом вестерн блоттинга с использованием антител к NP и к субъединице PA. Следует отметить, что связывание пептидов с вРНП приводит не к изменению электрофоретической подвижности компонентов вРНП и появлению зон, соответствующих комплексам белков с пептидом, а снижает интенсивность зон данных белков. Данное взаимодействие также приводит к образованию устойчивых к денатурации агрегатов, наблюдаемых на входе в гель.

Наличие агрегации в изолированных вРНП [Егоров и др., 2016] под действием коротких пептидов было подтверждено методом АСМ (Рисунок 4А) при обработке топограмм и получения распределения высот объектов в образце. Было показано, что под действием пептида в образце увеличивается содержание частиц большей высоты (от 20 нм и выше), а также появляются агрегаты высотой 30-35 нм, при этом снижается число частиц высотой

10-15 нм, по-видимому, соответствующих интактным ВРНП (Рисунок 4Б). Следует отметить, что агрегатов, отмеченных на Рисунке 4А, в интактных ВРНП (без пептида) не наблюдается.

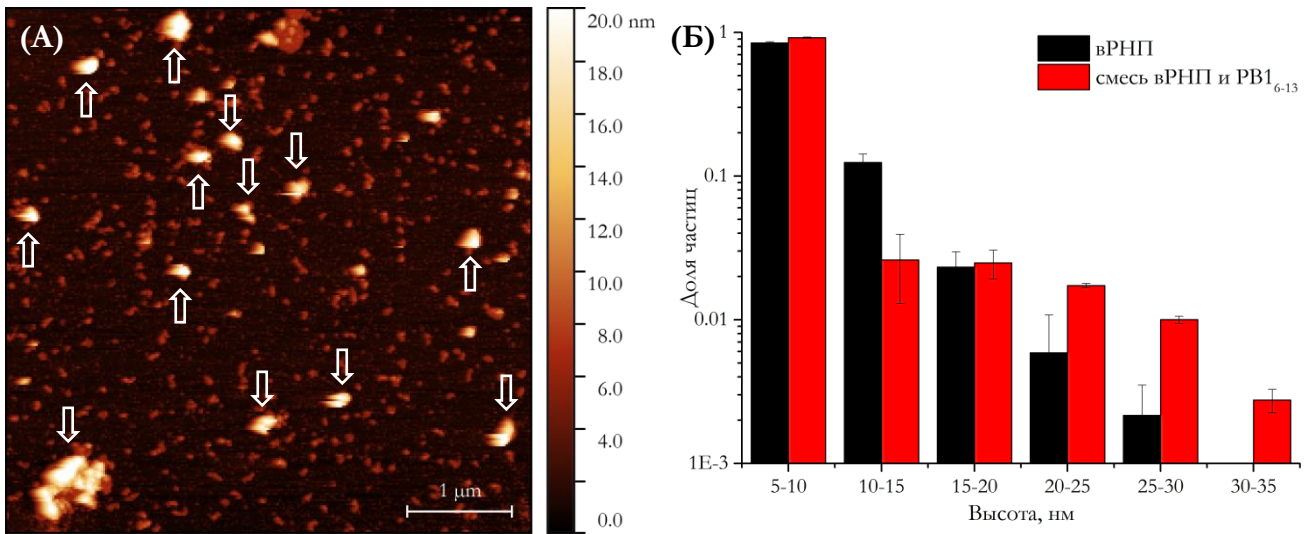


Рисунок 4 – **(А)** Топография поверхности образца, содержащего ВРНП, инкубированного с пептидом PB1<sub>6-13</sub>. Стрелками отмечены агрегаты ВРНП. Масштабный отрезок соответствует 1 μм, линейка псевдоцвета указывает на высоту объектов (нм). **(Б)** Распределение частиц, обнаруженных в образцах, содержащих интактные ВРНП (чёрный) и ВРНП с пептидом (красный). N = 574 и 688 соответственно

Методом ППР было установлено, что NP в мономерной форме (вне ВРНП) не взаимодействует с пептидом PB1<sub>6-14</sub>. Таким образом, можно сделать вывод о том, что агрегация ВРНП вызвана взаимодействием пептида и полимерного комплекса в составе частицы ВРНП, что соответствует гипотезе об индукции конформационного перехода в PB1<sub>N</sub> под действием коротких пептидов.

Следует отметить, что наличие агрегации ВРНП под действием пептида может указывать на его способность воздействовать на PB1<sub>N</sub> в уже сформированном полимерном комплексе, что согласуется с данными МД, согласно которым PB1<sub>N</sub> в структуре гетеротримера полимерного комплекса частично экспонирован на поверхность комплекса.

#### 4. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ И PB1<sub>N</sub> НА МОДЕЛИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

В дальнейшей части работы на модели клеточных культур и *in vivo* был использован пептид Ac-PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub>, поскольку внесённые модификации обеспечивают большую устойчивость пептидов к экзопротеазам, что, возможно, привело к наибольшей противовирусной активности этой модификации пептида в [Matusevich и др., 2015], показанной на клетках MDCK.

Для подтверждения наличия агрегации PB1<sub>N</sub> под действием коротких пептидов на модели клеточных культур были проведены эксперименты, в которых индукция агрегации PB1<sub>N</sub> была вызвана в клетках MDCK, трансфицированных модельным белком слияния PB1<sub>6-25</sub>-GFP, к которым через сутки после трансфекции добавляли пептид Ac-PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub>. С использованием пептида FITC-PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub> было показано, что через час инкубации короткие пептиды способны к проникновению в клетки MDCK.

После трансфекции в клетках происходит экспрессия модельного белка, причём он диффузно распределяется по цитоплазме, как при добавлении клеточной среды, так и под действием растворителя пептида (Рисунок 5А). В то же время, под действием короткого пептида происходит агрегация модельного белка в клетках (Рисунок 5Б). Следует отметить, что при использовании плазмиды, кодирующей GFP, агрегация не происходит ни под действием растворителя, ни под действием пептида, а сам белок также диффузно распределяется по цитоплазме (аналогично Рисунку 5А).

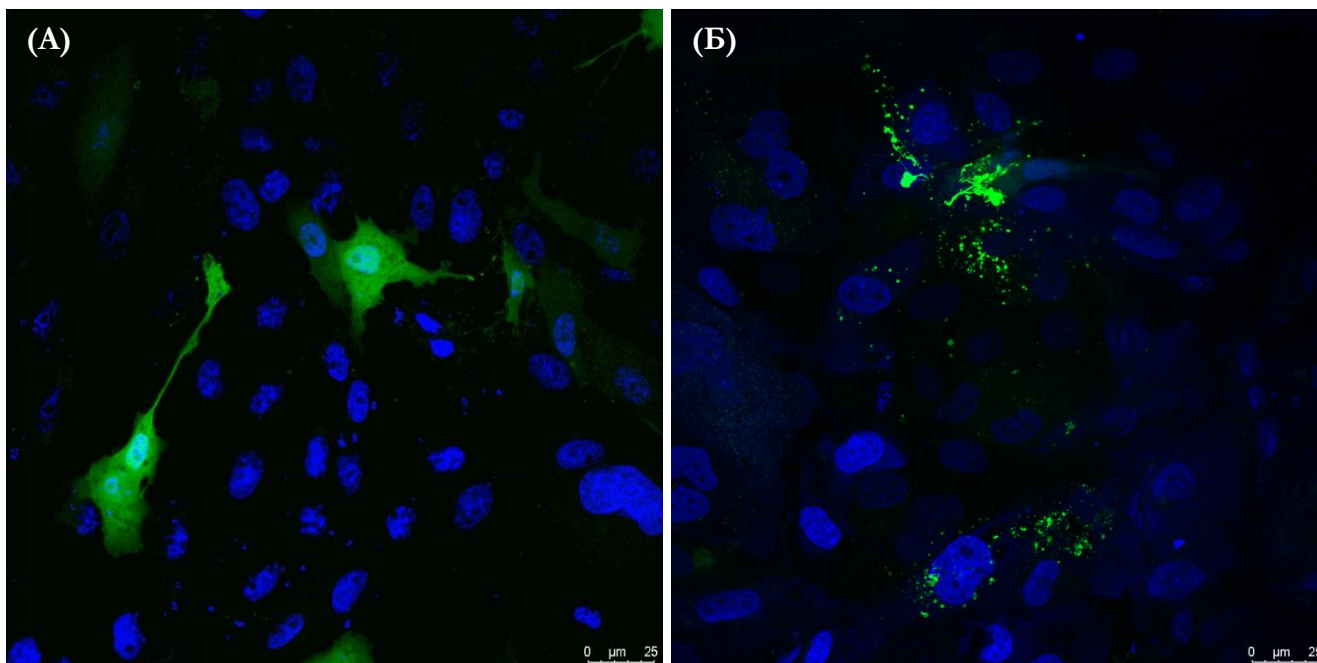


Рисунок 5 – Результаты конфокальной микроскопии клеток MDCK (оптический срез, проходящий через ядро), трансфицированных плазмидой, кодирующей PB1<sub>6-25</sub>-GFP, и (А) инкубированных без пептида; (Б) инкубированных с пептидом. Синим цветом показаны окрашенные DAPI ядра. Масштабный отрезок соответствует 25  $\mu\text{m}$

Таким образом, под действием пептида происходила специфическая агрегация экспрессировавшегося в клетке белка слияния PB1<sub>6-25</sub>-GFP, что подтверждает возможность индукции конформационного перехода в PB1<sub>N</sub> под действием пептида Ac-PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub> не только в модельной пептидной системе и *in vitro*, но и на модели клеточных культур.

## 5. ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ *IN VIVO*

### 5.1 Пептиды PB1<sub>6-13</sub> и PB1<sub>6-25</sub> образуют амилоидоподобные фибриллы

Исследование противовирусной активности пептидов на модели гриппозной инфекции *in vivo* на лабораторных животных предполагает использования концентрации тестируемых соединений свыше 1 мМ. В данных условиях короткие пептиды образовали агрегаты. Методом АСМ (Рисунок 6А) было показано, что в агрегаты сходны по морфологии с амилоидоподобными фибриллами.

Обработка спектров МУРН пептидов (Рисунок 6Б), построенных в логарифмическом масштабе и аппроксимированных по методу наименьших квадратов степенной функцией ( $I \sim q^A$ , где  $A$  – тангенс угла наклона функции, принимающий вид прямой в логарифмических координатах), также указывало на присутствие в образце полимерной цепи в плохом

растворителе. Образующиеся агрегаты имеют амилоидоподобную природу, что было показано спектрофотометрически с использованием специфического красителя КК. Таким образом, было показано, что при растворении как пептида РВ1<sub>6-13</sub>, так и РВ1<sub>6-25</sub> в PBS в концентрациях порядка 1 мМ, они образуют амилоидоподобные фибриллы.

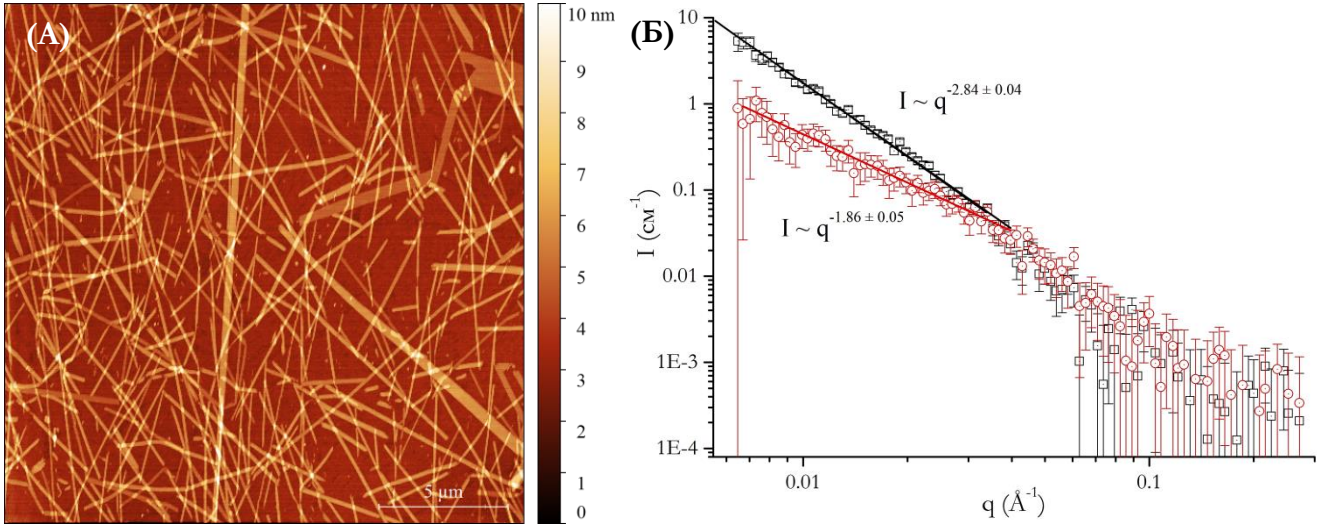


Рисунок 6 – (А) Результаты атомно-силовой микроскопии агрегатов пептида РВ1<sub>6-13</sub>. Масштабный отрезок соответствует 5 мкм. Линейка псевдоцвета указывает высоту объектов (нм). (Б) Спектр МУРН на растворе пептидов РВ1<sub>6-25</sub> (красные круги) и РВ1<sub>6-13</sub> (чёрные квадраты). Данные аппроксимированы по методу наименьших квадратов степенными функциями с показателями  $1.86 \pm 0.05$  ( $R^2 = 0.97$ ) и  $2.84 \pm 0.04$  ( $R^2 = 0.99$ ) соответственно.  $I$  – интенсивность рассеяния ( $\text{см}^{-1}$ ),  $q$  – вектор рассеяния ( $\text{Å}^{-1}$ ),  $q = (4\pi \sin\theta)/\lambda$  ( $2\theta$  – угол рассеяния) (адаптировано из [Zabrodskaia и др., 2018])

## 5.2 Кинетика образования амилоидоподобных фибрилл

Гомоолигомеризация короткого пептида РВ1<sub>6-14</sub>, а именно определение равновесной константы диссоциации  $K_d$  этого процесса, была изучена методом ППР аналогично [Stravalaci и др., 2011]. Полученная сенсограмма (Рисунок 7А) может быть описана моделью двухступенчатой реакции (Формула 2): в результате взаимодействия пептида РВ1<sub>6-14</sub> с самим собой ( $A$ ) образуется комплекс  $AA$ , после чего следует структурное изменение этого комплекса ( $AA^*$ ), который не может напрямую диссоциировать обратно на компоненты, минуя этап  $AB$ .



$k_{a1}$  и  $k_{a2}$  – константы ассоциации первой и второй реакции соответственно,  $k_{d1}$  и  $k_{d2}$  – константы диссоциации первой и второй реакции соответственно.

Рассчитанная в данном приближении равновесная константа диссоциации  $K_d$  составила  $0.29 \mu\text{M}$ , что указывает на склонность пептида к гомоолигомеризации. Полученные данные также свидетельствуют о склонности пептида к образованию фибрилл по механизму, описанному для амилоидогенных полипептидов.

Полученная константа гомоолигомеризации пептида РВ1<sub>6-14</sub> на порядок превышает таковую для взаимодействия модифицированного пептида РВ1<sub>6-14</sub> и РВ1<sub>1-25</sub>, определённую методом MST в растворе ( $\sim 1 \mu\text{M}$ ) на модельной пептидной системе. В совокупности с данными, полученными методом МУРН на смеси пептидов РВ1<sub>6-25</sub> и РВ1<sub>6-13</sub> (Рисунок 7Б),



указывающих, что спектр смеси соответствует математической сумме спектров отдельных компонентов, можно заключить, что после образования фибрилл пептиды уже не способны ко взаимодействию, а активной формой пептида PB1<sub>6-13</sub>, способной влиять на вторичную структуру PB1<sub>N</sub>, является, в первую очередь, мономер.

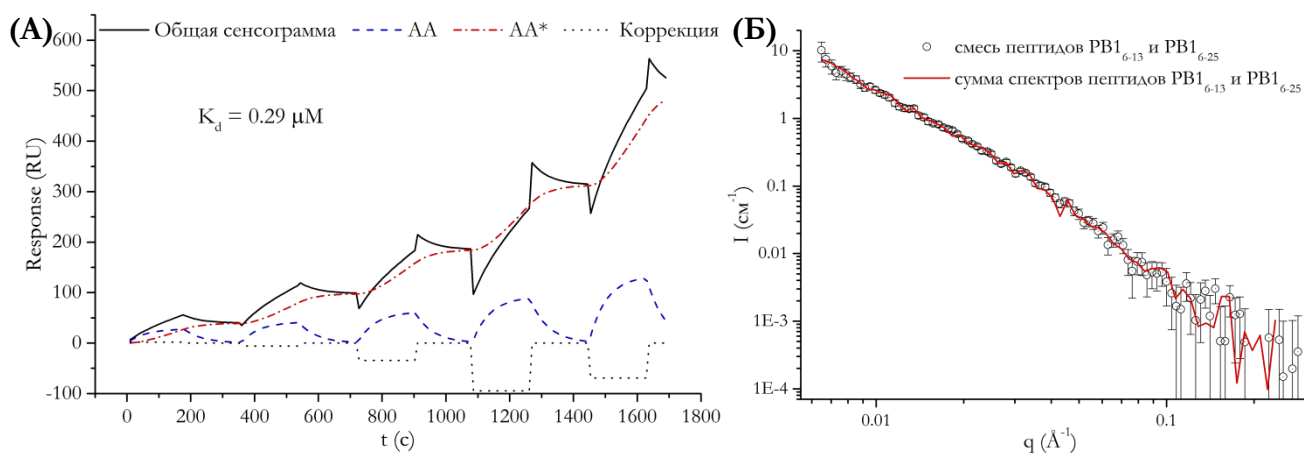


Рисунок 7 – **(А)** Сенсограмма (зависимость отклика *Response* от времени *t*) взаимодействия пептида PB1<sub>6-14</sub> с самим собой (чёрная сплошная кривая), приближенная моделью двухступенчатой реакции (красная и синяя кривые) с поправкой на эффекты объёма и дрейфа, «Коррекция» (чёрная пунктирная кривая).  $K_d$  – равновесная константа диссоциации. RU – резонансные единицы. **(Б)** Спектры МУРН на растворе смеси пептидов PB1<sub>6-25</sub> и PB1<sub>6-13</sub> в фибриллярной форме (чёрные точки) и нормированная математическая сумма кривых рассеяния для PB1<sub>6-25</sub> и PB1<sub>6-13</sub> по-отдельности (красная кривая) ( $R^2 = 0.98$ ). *I* – интенсивность рассеяния (см<sup>-1</sup>), *q* – вектор рассеяния (Å<sup>-1</sup>),  $\mathbf{q} = (4\pi\sin\theta)/\lambda$  ( $2\theta$  – угол рассеяния) (адаптировано из [Zabrodskaya и др., 2018])

### 5.3 Получение пептидов в различных агрегационных состояниях

Для проведения экспериментов *in vivo* был подобран оптимальный растворитель, в котором короткие пептиды присутствовали бы в форме активных мономеров, а не в форме амилоидоподобных фибрилл или агрегатов. Количество растворившегося пептида в тестируемом растворителе оценивали методом обращённо-фазной хроматографии, образование фибрилл и их амилоидоподобную природу – методами ЭМ и связыванием с красителем КК. В результате тестирования различных концентрация DMSO в воде (1%, 2%, 5%, 10%, 20% и 50%) в качестве растворителя было установлено, что максимально возможная растворимая концентрация коротких пептидов составляет 0.2 мМ в 10% DMSO. Оптимальным растворителем оказался 5% DMSO/5% EtOH в воде, растворимость пептида в котором достигала 1 мМ.

### 5.4 Противовирусная активность пептида на модели клеточных культур

Сохранение противовирусной активности пептида Ac-PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub>, показанной в [Matusevich и др., 2015] на модели клеточных культур, в подобранном растворителе 5%EtOH/5%DMSO было установлено на клетках MDCK, заражённых вирусом гриппа A/California/07/2009 (H1N1pdm) в различных разведениях. Было показано, что пептид Ac-PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub> сохраняет свою противовирусную активность в отношении вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm) на модели клеточных культур, сопоставимую с таковой для препарата сравнения озельтамивир карбоксилат.

### 5.5 Противовирусная активность пептида *in vivo*

Противовирусная активность пептида Ac-PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub> *in vivo* была оценена на модели гриппозной инфекции мышей, заражённых вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm). Пептид, растворитель и препарат сравнения Занамивир вводили в лечебно-профилактической схеме. Через 3 суток в лёгких экспериментальных животных был оценен уровень репродукции вируса гриппа (Рисунок 8). Доза вводимого пептида была выбрана в соответствии с данными по растворимости и активности пептида, полученными на модельной пептидной системе *in vitro*.

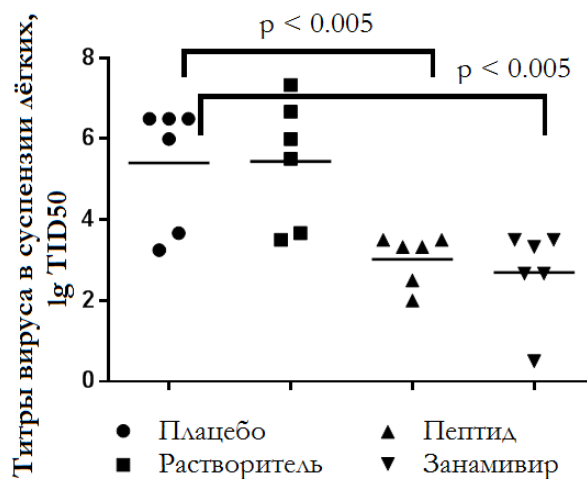


Рисунок 8 – Репродукция вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm) в ткани лёгких мышей Balb/c через 3 суток после инфицирования,  $p < 0.005$ , дисперсионный анализ ANOVA для попарных сравнений

В легких мышей, заражённых вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm) и получавших пептид, отмечено достоверное снижение инфекционной активности вируса по сравнению с группой плацебо. Снижение титра вируса было сравнимо с действием препарата сравнения Занамивир.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были уточнены межсубъединичные контакты, в частности, между субъединицами PB1 и PA, на основании проведённого впервые моделирования молекулярной динамики гетеротримера полимеразного комплекса вируса гриппа A человека. Было показано, что N-концевой участок PB1<sub>1-37</sub> находится в интерфейсе взаимодействия с PA<sub>C</sub>, что согласуется с литературными данными, и может быть рассмотрен как модель изолированного N-концевого домена. На основании полученных данных была создана модельная пептидная система для изучения взаимодействия N-концевого участка субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса гриппа с короткими пептидами.

Показано, что короткие пептиды способны взаимодействовать с PB1<sub>N</sub>, индуцируя в нём конформационный переход и образование амилоидоподобных агрегатов. Применение метода времяразрешённого малоуглового рентгеновского рассеяния с использованием экспериментальной установки, оснащённой системой остановленного потока, в комбинации с математической обработкой набора спектров методом сингулярного разложения позволило проследить структурную кинетику взаимодействия пептидов в растворе в близких к нативным условиям и определить характерное время этого процесса, составившее около 120 с. Методом

микромасштабного термофореза в растворе была определена равновесная константа диссоциации процесса взаимодействия коротких пептидов и PB1<sub>N</sub>, составившая порядка 1  $\mu$ M. Применение данного метода позволило избежать влияния повышенной локальной концентрации лиганда на поверхности раздела фаз, что, при использовании традиционного метода поверхностного плазмонного резонанса, может затруднять оценку константы связывания для взаимодействий, приводящих к конформационным переходам.

При помощи сочетания методов аффинной хроматографии в растворе с последующей масс-спектрометрической идентификацией белков было показано, что короткие пептиды способны к специфическому связыванию с рибонуклеопротеиновым комплексом вируса гриппа. При помощи ЭФ в ПААГ было показано, что такое связывание приводит к образованию устойчивых к денатурирующим условиям агрегатов вРНП. Изучение морфологии агрегатов, полученных в результате действия короткого пептида на выделенные вРНП, при помощи атомно-силовой микроскопии с последующим анализом топограмм, подтвердило наличие такой агрегации. Анализ взаимодействия свободного нуклеопротеина с коротким пептидом методом ППР позволил исключить влияние связывания этого компонента на агрегацию вРНП, что указывает на взаимодействие короткого пептида с полимеразным комплексом *in vitro*. Данные эксперименты также указывают на то, что короткие пептиды способны индуцировать конформационный переход не только вновь синтезированных субъединиц PB1 полимеразного комплекса вируса гриппа А, но так же и находящихся в составе комплекса.

На модели клеточных культур методом конфокальной микроскопии было показано образование внутриклеточных агрегатов белка слияния, содержащего PB1<sub>N</sub> и зелёный флуоресцентный белок, под действием модифицированного пептида PB1<sub>6-14</sub>. Таким образом, было показано, что короткие пептиды способны к взаимодействию с PB1<sub>N</sub> не только в модельной пептидной системе, но и на модели клеточных культур.

Пептид способен к образованию амилоидоподобных фибрилл в концентрациях выше 0.1 мМ, что было показано методами АСМ и спектрофотометрии в присутствии специфического для амилоидоподобных фибрилл красителя Конго красный. В форме фибрилл пептид не способен к индукции конформационного перехода в PB1<sub>N</sub>, что было показано методом МУРН. Это объясняется высокой склонностью пептида к гомоолигомеризации ( $K_d = 0.29 \mu$ M, определена методом ППР) при превышении критической концентрации. Использование оптимального растворителя позволяет повысить значение критической концентрации до 1 мМ, что необходимо для дальнейшего изучения действия пептида *in vivo*.

Пептид в субкритических концентрациях и в оптимальном растворителе сохраняет свою противовирусную активность на модели клеточных культур и снижает титр вируса в лёгких мышей *in vivo*.

## ВЫВОДЫ

1. Пептиды, соответствующие N-концевому участку субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса А, PB1<sub>6-25</sub> и PB1<sub>1-25</sub>, могут быть использованы в качестве модельной пептидной системы для изучения взаимодействия этого участка с пептидами PB1<sub>6-13</sub> и PB1<sub>6-14</sub>, так как по данным моделирования молекулярной динамики полноразмерного гетеротримера полимеразного комплекса вируса гриппа А человека структура PB1<sub>N</sub> определяется взаимодействием только в пределах участка PB1<sub>1-37</sub>.

2. N-концевой участок субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса А PB1<sub>6-25</sub> способен принимать бета-конформацию *in vitro*, что было показано методом кругового дихроизма. Воздействие пептидов PB1<sub>6-13</sub> и PB1<sub>6-14</sub> на N-концевой участок субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса А индуцирует в PB1<sub>6-25</sub> конформационный переход, приводящий к образованию агрегатов с гидродинамическим диаметром 500-1000 нм в модельной пептидной системе. Амилоидоподобная природа агрегатов была установлена с применением специфического красителя Конго красный. С использованием метода времяразрешённого малоуглового рентгеновского рассеяния в комбинации с математической обработкой набора спектров методом сингулярного разложения было определено характерное время взаимодействия, составившее около 120 с. Метод микромасштабного термофореза в растворе позволил определить равновесную константу диссоциации  $K_d = 1.01 \pm 0.26 \mu\text{M}$  взаимодействия флуоресцентно меченого аналога пептида PB1<sub>6-14</sub> и PB1<sub>N</sub>.

3. Сочетание методов аффинной хроматографии в растворе с последующей MALDI масс-спектрометрической идентификацией белков позволило установить способность пептидов к специфическому связыванию с ВРНП. Взаимодействие с полимеразным комплексом в составе ВРНП приводит к образованию стабильных агрегатов *in vitro*, которые были детектированы при помощи метода атомно-силовой микроскопии.

4. Модифицированный пептид PB1<sub>6-14</sub> вызывает образование детектируемых при помощи конфокальной микроскопии внутриклеточных агрегатов модельного белка слияния N-концевого участка субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса гриппа и зелёного флуоресцентного белка на модели клеточных культур.

5. Модифицированный пептид PB1<sub>6-14</sub> в форме мономеров снижает титр вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm) в лёгких мышей *in vivo*.

### Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы исследования.

Исследованный в данной работе пептид Ac-PB1<sub>6-14</sub>-NH<sub>2</sub> может послужить основой для создания противовирусного препарата, эффективного в отношении широкого спектра штаммов вируса гриппа А. Применённый комплекс методов может быть использован для изучения других пептидов, способных к индукции конформационных переходов.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Zabrodskaya, Y.A., Lebedev, D.V., Egorova, M.A., Shaldzhyan, A.A., Shvetsov, A.V., Kuklin, A.I., Vinogradova, D.S., Klopov, N.V., Matusevich, O.V., Cheremnykh, T.A., Dattani, R., Egorov, V.V. The amyloidogenicity of the influenza virus PB1-derived peptide sheds light on its antiviral activity // *Biophysical Chemistry*. – 2018. – V. 234. – P.16-23.

2. Егоров, В.В., Шалджян, А.А., Горшков, А.Н., **Забродская, Я.А.**, Лебедев, Д.В., Ку克林, А.И., Ксенофонтова, О.И., Швецов, А.В., Васин, А.В., Цыбалова, Л.М., Исаев-Иванов, В.В.. Структурные особенности нуклеопротеиновых частиц вируса гриппа А по данным малоуглового рентгеновского рассеяния // *Поверхность. Рентгеновские, Синхротронные и Нейтронные Исследования*. – 2016. – №3. – С.62-65.

3. Egorov, V.V., Matusevich, O.V., Shaldzhyan, A.A., Skvortsov, A.N., **Zabrodskaya, Y.A.**, Garmay, Y.P., Landa, S.B., Lebedev, D.V., Zarubayev, V.V., Sirotkin, A.K., Vasin, A.V., Kiselev, O.I. Structural Features of the Peptide Homologous to 6-25 Fragment of Influenza A PB1 Protein. *International Journal of Peptides*. – 2013. – V.2013. – 370832.

4. Егоров, В.В., **Забродская, Я.А.**, Тараскин, А.С., Егорова, М.А. Яблочко от яблоньки: пептиды, взаимодействующие с белками вируса гриппа // 1-ая Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии и иммунофармакологии» (Санкт-Петербург, 21-22 декабря 2017 г.).

5. **Забродская, Я.А.**, Бобков, Д.Е., Бродская, А.В., Виноградова, Д.С., Датгани, Р., Егоров, В.В., Егорова, М.А., [Киселёв, О.И.], Ку克林, А.И., Лебедев, Д.В., Матусевич, О.В., Черемных, Т.А., Шалджян, А.А., Швецов, А.В., Шурыгина, А.-П.С. Структурные основы противовирусной активности пептида-фрагмента субъединицы PB1 полимеразы вируса гриппа // Сопещание пользователей Курчатовакого комплекса синхротронно-нейтронных исследований (20-23 ноября 2017 г), Сборник тезисов докладов. Москва. – 2017. – С.109.

6. Егоров, В.В., Егорова, М.А., **Забродская, Я.А.**, Исаев-Иванов, В.В., Ку克林, А.И., Лебедев, Д.В., Шалджян, А.А., Швецов, А.В. Пептидные модели в разработке новых препаратов // Сопещание пользователей Курчатовакого комплекса синхротронно-нейтронных исследований (20-23 ноября 2017 г), Сборник тезисов докладов. Москва. – 2017. – С.106.

7. **Zabrodskaaya, Y.A.**, Shalzhyan, A.A., Lebedev, D.V., Egorova, M.A., Kuklin, A.I., Matusевич, O.V., Egorov, V.V. Amiloidogenicity of PB1-derived peptide sheds light on its antiviral action // Condensed matter research at the IBR-2: Programme and Abstracts of the International conference (Dubna, Oct. 9-12, 2017), Dubna, JINR. – 2017 – P.193.

8. **Zabrodskaaya, Y.**, Shaldzhyan, A., Egorova, M., Lebedev, D., Petrova-Brodskaaya, A., Shurygina, A.-P., Bobkov, D., Gorshkov, A., Bondarenko, A., Matusевич, O., Egorov, V. Structural bases of PB1 derived peptide mechanism of action // International conference «Trends in Influenza Research»: Abstract book. Saint-Petersburg, September 18-20, 2017. – 2017. – P.81-82.

9. **Ягудина, Я.А.**, Шалджян, А.А., Лебедев, Д.В., Егорова, М.А., Ку克林, А.И., Матусевич, О.В., Егоров, В.В. Амилоидогенный пептид из белка PB1 вируса гриппа, обладающий противовирусной активностью // Сборник тезисов XVIII Зимней молодежной школы по биофизике и молекулярной биологии (11-16 марта 2017 г.). Гатчина. – 2017. – С.148-149.

10. Егоров, В.В., Радулеску, А., Шалджян, А.А., Горшков, А.Н., **Забродская, Я.А.**, Сергеева, М.В., Ку克林, А.И., Плотникова, М.А., Комиссаров, А.Б., Некрасов, П.А., Клотченко, С.А., Васин, А.В., Исаев-Иванов, В.В., Цыбалова, Л.М., Лебедев, Д.В. Структурные особенности нуклеопротеиновых частиц вируса гриппа А/Н3N2 дикого типа и его холодоадаптированного штамма по данным малоуглового рассеяния // Сопещание и Молодежная конференция по использованию рассеяния нейтронов и синхротронного излучения в конденсированных средах (РНСИ-КС-2014, 27-31 октября 2014 г.). – 2014.

11. **Забродская, Я.А.**, Шалджян, А.А., Миргородская, О.А., Егоров, В.В. Поиск пептидов, способных к взаимодействию с белками вируса гриппа // Материалы V Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням (25-27 марта 2013 г.). – 2013. – С.154.

12. **Забродская, Я.А.**, Шалджян, А.А., Матусевич, О., Егоров, В.В. Пептиды, способные к взаимодействию с белками вируса гриппа // Конференция молодых специалистов. Грипп: эпидемиология, вирусология, профилактика и лечение (24-25 октября 2012 г.). Сборник статей. – 2012. – С.21-22.

13. **Забродская, Я.А.**, Егоров, В.В., Матусевич, О., Гармай, Ю.П., Васин, А.В., Киселёв, О.И. Структурные особенности сайта связывания белка PB1 и белка PA вируса гриппа А // Биология – наука XXI века: 16-я Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых (16-21 апреля 2012 г.). Сборник тезисов. – 2012. – С.109-110.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- а.о. – аминокислотный остаток  
 АСМ – атомно-силовая микроскопия  
 ВР-МУРР – времяразрешённое малоугловое рассеяние рентгеновских лучей  
 вРНП – рибонуклеопротеиновый комплекс вируса гриппа  
 КД – круговой дихроизм  
 КК – краситель Конго красный  
 ЛКС – лазерная корреляционная спектроскопия  
 МУРН – малоугловое рассеяние нейтронов  
 ППР – поверхностный плазмонный резонанс  
 ЭМ – электронная микроскопия  
 ЭФ в ПААГ – электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле  
 DMSO – dimethylsulphoxid, диметилсульфоксид  
 EtOH – ethanol, этанол  
 GFP – green fluorescent protein, зелёный флуоресцентный белок  
 MST – microscale thermophoresis, микромасштабный термофорез  
 NP – nucleoprotein, нуклеопротеин  
 PA – polymerase acid, кислая полимеразы  
 PA<sub>C</sub> – С-концевой участок субъединицы PA полимеразного комплекса вируса гриппа  
 PB1 – polymerase basic 1, основная полимеразы 1  
 PB1<sub>6-13</sub>, PB1<sub>6-14</sub>, PB1<sub>6-25</sub>, PB1<sub>1-25</sub> – N-концевой участок субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса гриппа А с 6 по 13 а.о., с 6 по 14 а.о., с 6 по 25 а.о. и с 1 по 25 а.о. соответственно  
 PB1<sub>N</sub> – N-концевой участок субъединицы PB1 полимеразного комплекса вируса гриппа  
 PBS – phosphate buffered saline, фосфатно-солевой буфер  
 SVD – singular value decomposition, метод сингулярного разложения

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор искренне благодарит своего научного руководителя, идейного вдохновителя работы, кандидата биологических наук, **Егорова Владимира Валерьевича**, за активную помощь и поддержку на всех этапах выполнения данного исследования. Особую благодарность автор выражает **Лебедеву Дмитрию Витальевичу** за помощь в проведении экспериментов и обработке данных по малоугловому рассеянию, а также за обсуждение и критику всех проводимых экспериментов. Автор благодарит всех соавторов, без которых работа не могла бы представлять собой полноценное и многогранное исследование: **А.В. Швецов**, **М.А. Егорова**, **А.А. Шалджян**, **А.Н. Скворцов**, **Д.С. Виноградова**, **А.И. Ку克林**, **П.А. Некрасов**, **С.Б. Ланда**, **А.К. Сироткин**, **Н.В. Клопов**, **Т.А. Черемных**, **О.В. Магусевич**. Автор выражает признательность всем, кто помог реализовать подготовку и осуществление экспериментов на клеточных культурах методом конфокальной микроскопии (**А.Е. Шмидт**, **А.Б. Бондаренко**, **Д.А. Бобков**), а также установил противовирусную активность пептида на модели клеточных культур (**Д.С. Даниленко**, **А.В. Бродская**) и проводил эксперименты *in vivo* (**А.А. Штро**). Автор благодарит **В.В. Исаева-Иванова**, **О.И. Киселёва** и **А.В. Васина** за возможность реализации данного исследования.