

ПРИМЕНЕНИЕ ДАННЫХ БЕЛКОВОЙ КРИСТАЛЛОГРАФИИ И МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПЕПТИДНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

© 2023 г. А. С. Ивановский^{2,*}, И. А. Колесников¹, Ю. В. Кордонская^{1,2}, А. В. Ермаков¹,
М. А. Марченкова^{1,2}, В. И. Тимофеев^{1,2}, Ю. В. Писаревский^{1,2},
Ю. А. Дьякова¹, М. В. Ковальчук¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника РАН, Москва, Россия

*E-mail: a. Iwanowski@gmail.com

Поступила в редакцию 22.04.2023 г.

После доработки 20.06.2023 г.

Принята к публикации 20.06.2023 г.

Проанализирован геном африканской чумы свиней и выявлен белок, способный служить иммуногеном. Для водорастворимого фрагмента данного белка методом молекулярной динамики показано, что он стабилен в водно-солевом растворе. Иммуномоделирование показало, что данный фрагмент вызывает клеточный ответ, следовательно, может быть использован в качестве прототипа вакцины.

DOI: 10.31857/S0023476123600805, EDN: YEINQY

ВВЕДЕНИЕ

При разработке пептидных вакцин используются антигены патогенов, в качестве которых обычно выступают трансмембранные белки, проблемы использования которых заключаются в их нерастворимости в воде и практической невозможности экспрессии.

В последнее время эти трудности обходят за счет выделения насыщенного эпитопами водорастворимого и легко экспрессируемого фрагмента иммуногенного белка.

В настоящей работе такой подход применен к вирусу африканской чумы свиней (ВАЧС).

Одной из основных антигенных детерминант ВАЧС является кодируемый геном EP402R белок, гомологичный рецептору адгезии Т-клеток, CD2 [1].

Африканская чума свиней — это вирусная болезнь свиней, для которой характерны лихорадка, цианоз кожи и обширные кровоизлияния во внутренние органы [2]. Распространителями заболевания являются больные животные и вирусносители. Болезнь не поражает человека, однако в настоящее время не существует эффективных методов профилактики и лечения данного заболевания, а все зараженные животные погибают [3]. Для борьбы с распространением африканской чумы свиней все поголовье в обнаруженном очаге и радиусе 20 км от него умерщвляется бес-

кровным методом и сжигается, что наносит существенный ущерб животноводству [4].

Возбудителем африканской чумы свиней является ДНК-содержащий вирус, представитель рода асфивирусов и семейства асфаровирусов [5, 6]. Вирус содержит ~180 генов [7]. Как и при других вирусных геморрагических лихорадках, основными клетками-мишенями для репликации являются клетки моноцитарного и макрофагального происхождения. Проникновение вируса в клетку-хозяина опосредуется рецептором, но точный механизм эндоцитоза в настоящее время неясен [8]. Резервуарами ВАЧС являются некоторые виды клещей и дикие африканские свиньи [9].

Разработка пептидной вакцины против ВАЧС состояла из двух этапов.

На первом этапе [10] смоделировали пространственную структуру оболочечного белка ВАЧС, рассчитали его топологию относительно клеточной мембраны, предсказали эпитопы для этого белка, провели оценку их иммуногенности, аллергенности, токсичности, изучили вариабельность аминокислот в белке и консервативность найденных эпитопов.

В настоящей работе, представляющей второй этап разработки вакцины, проведена оценка стабильности этого белка в водном растворе методом молекулярной динамики, а также иммуномо-

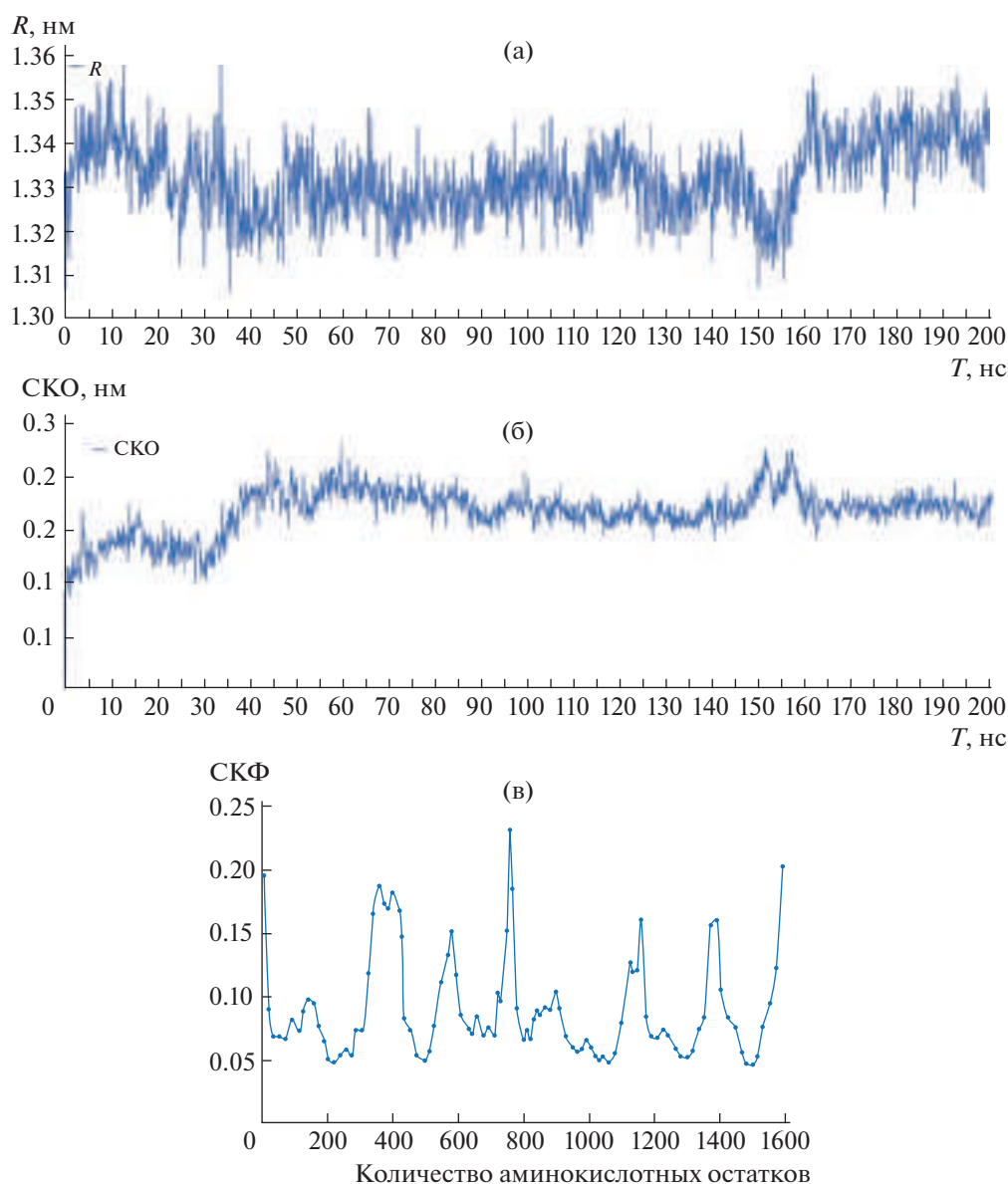


Рис. 1. Радиус гирации фрагмента иммуногенного белка вируса африканской чумы свиней R_g nm (а), СКО фрагмента иммуногенного белка ВАЧС (б), СКФ атомов фрагмента иммуногенного белка ВАЧС (в).

делирование клеточного ответа на данный антиген. Выявлен богатый эпитопами фрагмент белка, который с помощью вычислительного эксперимента был также проверен на стабильность в водно-солевом растворе и на иммуногенность. Показано, что данный антиген может быть использован для разработки вакцины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фрагмент белка для дальнейшей работы с ним выделен из целевого белка с использованием программы PyMol [11].

Молекулярно-динамическое (МД) моделирование выполнено для вакцины с использованием версии 2020.3 пакета динамического моделирования GROMACS [12].

Силовое поле AMBER99SB-ILDN [13] использовали с моделью воды TIP3P и добавлением 0.15 М KCl к системе. Для нейтрализации общего заряда системы к ней были добавлены некоторые дополнительные ионы. Чтобы расслабить структуру и избежать стерических столкновений в дальнейшем моделировании, минимизацию энергии проводили с шагом 1 фс до максимальной силы 1000.0 кДж/моль/нм. После этого давление и температура системы были уравнове-

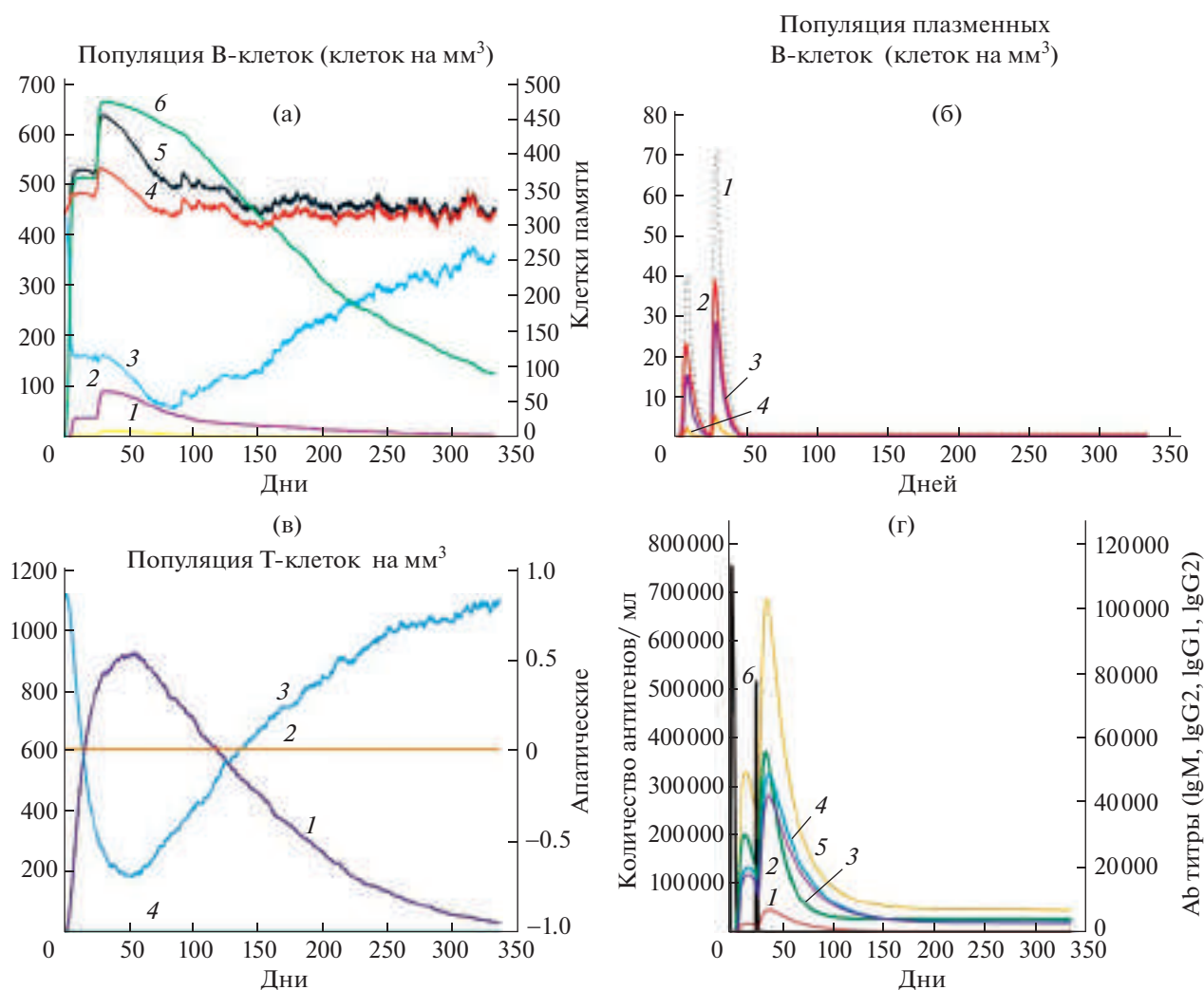


Рис. 2. Временные зависимости клеток, представляющих иммунный ответ организма свиньи на введение антигена: популяции В-клеток (а): 1 – В-изотип IgG2, 2 – В-изотип IgG1, 3 – В-изотип IgM, 4 – В-клетки памяти, 5 – неактивированные В-клетки, 6 – общее значение. Особое внимание следует обратить на популяцию компетентных В-клеток (2); плазматических В-клеток (б): 1 – IgM + IgG, 2 – IgM, 3 – IgG1, 4 – IgG2; популяции Т-клеток (в): 1 – активные, 2 – апатические, 3 – поющие, 4 – повторяющиеся; иммуноглобулинов (г): 1 – IgG2, 2 – IgM, 3 – IgG1, 4 – IgG1 + IgG2, 5 – IgM + IgG, 6 – Ag.

шены до 1 атм и 310 К путем запуска моделирования в NVT- и NPT-ансамбле (100 пс каждый) соответственно. Кроме того, давление и температуру системы контролировали с помощью модифицированного термостата Берендсена [14] и баростата Паринелло–Рахмана [15] с постоянной времени $\tau_{\text{t}} 1/4 0.1$ пс и $\tau_{\text{p}} 1/4 2$ пс соответственно. Продуктивное 200 нс МД-моделирование проводили в изотермическо-изобарическом ансамбле с временным шагом 2 фс. Алгоритм LINCS [16] использовали для ограничения связей с участием атомов водорода. Дальнейшие электростатические взаимодействия рассчитывали с использованием схемы суммирования Particle-Mesh Ewald [17].

Для иммуномоделирования клеточного ответа применяли приложение C-IMMSIMM [18]. Данный сервер – один из самых точных для исследования иммунного моделирования и прогнозирования адаптивного иммунитета. Сервер следует методам машинного обучения, аналогичным для прогнозирования иммунных взаимодействий, специфичных к эпитопам-мишеням [19]. Наряду с методами машинного обучения применяли технологию матрицы оценки позиции (PSSM) [20]. Количество шагов моделирования сервера C-IMMSIMM [18] составляло 1000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ траекторий был выполнен для 100 нс. Поскольку при моделировании использовались

периодические граничные условия, рецентрированием белковой молекулы осуществлялся ее возврат в ячейку моделирования. После этого проводили первичный анализ траекторий, включая расчет среднеквадратичных отклонений (СКО), радиуса инерции и среднеквадратических флуктуаций (СКФ). Соответствующие графики показаны на рис. 1. Изменения СКО показаны на рис. 1б, где видим, что СКО стабилизируется между 40 и 55 нм, что с учетом размера моделируемой системы говорит о ее высокой стабильности. Рисунок 1а показывает, что радиус гирации имеет тенденцию к уменьшению для прототипа вакцины, что свидетельствует о его уплотнении во время моделирования. СКФ атомов C- α -прототипа вакцины показаны на рис. 1в.

С использованием иммуномоделирования обнаружено, что стойкий первичный иммунный ответ вызывается вакциной против чумы свиней наряду со вторичным иммунным ответом. Две дозы вызвали естественный ответ против типичной вакцины. Иммуномоделирование показало, что введение вакцины приводит к повышению уровня активных В-клеток (рис. 2а), плазматических В-клеток (рис. 2б), Т-клеток (рис. 2в) наряду с постепенным повышением уровня различных иммуноглобулинов (рис. 2г). При этом вакцина стимулирует хелперные Т-клетки, указывая на лучшую адаптивность иммунитета [21]. Показано, что интерферон- γ , интерлейкин-23, интерлейкин-10 и интерферон- β , а также ряд разнообразных цитокинов, вызывающих иммунный ответ и защищающих организм от вирусов, вырабатываются при воздействии вакцины [22]. Полученные многообещающие показатели, в том числе повышение иммуноглобулинов, цитокинов, антиген-презентирующие, активных В-клеток, а Т-клетки указывают на эффективность разработанного прототипа вакцины против африканской чумы свиней. Тем не менее разработанный прототип требует экспериментальной проверки, чтобы доказать его эффективность, а также отсутствие токсического эффекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные результаты показывают возможность производить пептидные вакцины из фрагментов иммунокомпетентных белков. Выявлено, что выделенный фрагмент иммуногенного белка ВАЧС стабилен в водно-солевом растворе, а также способен вызывать клеточный ответ. На основе полученного фрагмента будет проведена разработка вакцины против африканской чумы свиней.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rodríguez J.M., Yáñez R.J., Almazán F. et al.* // J. Virol. 1993. V. 67 (9). P. 5312.
2. *Mettenleiter T.C., Sobrino F.* // Animal Viruses: Molecular Biology. 2008. V. 14. P. 5.
<https://doi.org/10.3201/eid1405.080077>
3. *Anderson E.C., Hutchings G.H., Mukarati N., Wilkinson P.J.* // Veterinary Microbiology. 1998. V. 62 (1). P. 1.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00187-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00187-4)
4. *Khomenko S., Beltrán-Alcrudo D., Rozstalnyy A. et al.* // Empress Watch. 2013. V. 28. P. 1
5. *Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G., Niemczuk K.* // Sci Rep. 2019. V. 9. P. 4556.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36823-0>
6. *Colson P., De Lamballerie X., Yutin N. et al.* // Arch Virol. 2013. V. 158. P. 2517.
<https://doi.org/10.1007/s00705-013-1768-6>
7. *Dixon L.K., Chapman D.A., Netherton C.L., Upton C.* // Virus Res. 2013. V. 173 (1). P. 3.
8. *Netherton C.L., Wileman T.E.* // Virus Res. 2013. V. 173 (1). P. 76.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.014>
9. *Gaudreault N.N., Madden D.W., Wilson W.C. et al.* // Front. Vet. Sci. 2020. V. 7. P. 215.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00215>
10. *Колесников И.А., Тимофеев В.И., Николенко М.В. и др.* // Кристаллография. 2023. Т. 68. № 6. С. 971.
<https://doi.org/10.31857/S0023476123600179>
11. <https://pymol.org/2/>
12. *Abraham M.J., Murtola T., Schulz R. et al.* // SoftwareX. 2015. V. 1. P. 19.
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
13. *Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K. et al.* // Proteins. 2010. V. 78. P. 1950.
<https://doi.org/10.1002/prot.22711>
14. *Berendsen H.J. C., Postma J.P. M., van Gunsteren W.F. et al.* // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. P. 3684.
<https://doi.org/10.1063/1.448118>
15. *Parrinello M., Rahman A.* // J. Chem. Phys. 1982. V. 76. P. 2662.
<https://doi.org/10.1063/1.443248>
16. *Hess B., Bekker H., Herman J.C. et al.* // J. Comput. Chem. 1997. V. 18. P. 1463.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12%3C1463::AID-JCC4%3E3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12%3C1463::AID-JCC4%3E3.0.CO;2-H)
17. *Darden T., York D., Pedersen L.* // J. Chem. Phys. 1993. V. 98 (12). P. 10089.
<https://doi.org/10.1063/1.464397>
18. <https://kraken.iac.rm.cnr.it/C-IMMSIM/index.php>
19. *Luckheeram R.V., Zhou R., Verma A.D., Xia B.* // Clin. Dev. Immunol. 2012.
<https://doi.org/10.1155/2012/925135>
20. *Rapin N., Lund O., Bernaschi M., Castiglione F.* // PubMed. 2010.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009862>
21. *Carvalho L., Sano Gi., Hafalla J. et al.* // Nat Med. 2002. V. 8. P. 166.
<https://doi.org/10.1038/nm0202-166>
22. *Abass O.A., Timofeev V.I., Sarkar B et al.* // J. Biomol. Struct. Dynamics. 2021. V. 40 (16). P. 7283.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1896387>