

Оригинальная статья / Original article

УДК 578

DOI: 10.18470/1992-1098-2024-4-6



***In silico* моделирование влияния мутации N294S на взаимодействие нейраминидазы N8 вируса гриппа с занамивиром**

Елена А. Рухлова¹, Галина С. Онхонова¹, Максим Н. Косенко¹, Иван М. Сулопаров¹, Иван А. Соболев², Александр Б. Рыжиков¹

¹Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, Россия

Контактное лицо

Елена А. Рухлова, стажер-исследователь отдела зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, Российская Федерация, Новосибирская область, рабочий посёлок Кольцово.

Тел. +7 (383) 363-47-10 (доб. 21-66)

Email ruhlova_ea@vector.nsc.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-3465-4577>

Формат цитирования

Рухлова Е.А., Онхонова Г.С., Косенко М.Н., Сулопаров И.М., Соболев И.А., Рыжиков А.Б. *In silico* моделирование влияния мутации N294S на взаимодействие нейраминидазы N8 вируса гриппа с занамивиром // Юг России: экология, развитие. 2024. Т.19, N 4. С. 68-74. DOI: 10.18470/1992-1098-2024-4-6

Получена 29 августа 2024 г.

Прошла рецензирование 27 сентября 2024 г.

Принята 15 октября 2024 г.

Резюме

Целью является исследование *in silico*, направленное на изучение взаимодействия нейраминидазы вируса гриппа птиц A/H5N8 с занамивиром с помощью методов сравнительного моделирования и молекулярного докинга. В работе рассматривали штаммы вируса гриппа птиц A/chicken/Tatarstan/88/2017 (дикий тип), A/chicken/Tatarstan/112/2017 (мутация N294S) в комплексе с ингибитором нейраминидазы занамивиром. В результате были получены структуры комплексов нейраминидазы двух штаммов вируса гриппа птиц A/H5N8 с занамивиром, проведен анализ данных. Использование таких методов как сравнительное моделирование и молекулярный докинг дает информацию о сродстве при взаимодействии с ингибиторами. Полученные данные можно использовать для дальнейшей работы по определению структур и выяснению возможных механизмов резистентности нейраминидазы.

Ключевые слова

Вирус гриппа птиц, нейраминидаза, ингибитор, мутация, молекулярный докинг.

In silico modeling of N294S mutation effect on the interaction of influenza virus N8 neuraminidase with zanamivir

Elena A. Rukhlova¹, Galina S. Onkhonova¹, Maksim N. Kosenko¹, Ivan M. Susloparov¹,
Ivan A. Sobolev² and Alexander B. Ryzhikov¹

¹Vector State Scientific Centre of Virology and Biotechnology, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-being, Koltsovo, Novosibirsk Oblast, Russia

²Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Principal contact

Elena A. Rukhlova, Intern Researcher, Department of Zoonotic Infections and Influenza, Vector State Scientific Center of Virology and Biotechnology, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-being; Koltsovo, Novosibirsk Oblast, Russia, 630559.

Tel. +7 (383) 363-47-10 (addit. 21-66)

Email rukhlova_ea@vector.nsc.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-3465-4577>

How to cite this article

Rukhlova E.A., Onkhonova G.S., Kosenko M.N., Susloparov I.M., Sobolev I.A., Ryzhikov A.B. *In silico* modeling of N294S mutation effect on the interaction of influenza virus N8 neuraminidase with zanamivir. *South of Russia: ecology, development*. 2024; 19(4):68-74. (In Russ.) DOI: 10.18470/1992-1098-2024-4-6

Received 29 August 2024

Revised 27 September 2024

Accepted 15 October 2024

Abstract

The aim of the study is an *in silico* modeling of avian influenza A/H5N8 virus neuraminidase and zanamivir interaction using homology modeling and molecular docking. A/chicken/Tatarstan/88/2017 (wild type) and A/chicken/Tatarstan/112/2017 (N294S mutation) influenza virus strains with zanamivir complexes were considered. The structures of two avian influenza virus A/H5N8 neuraminidase complexes with zanamivir were obtained and analysed.

Homology modeling and molecular docking provides information about neuraminidase and inhibitors affinity. The data obtained can be used for further investigation to determine the structures and elucidate possible mechanisms of neuraminidase resistance.

Key Words

Avian influenza virus; neuraminidase; inhibitor; mutation; molecular docking.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы по всему миру регистрируются вспышки высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5N8 с массовым падежом, выбраковкой инфицированных птиц и млекопитающих, что приводит к ограничениям торговли и усилению мер надзора. Высокопатогенный вирус гриппа птиц А/Н5N8 впервые был выявлен в Ирландии в 1983 году [1]. С тех пор периодически по всему миру регистрируются вспышки среди дикой и домашней птицы [2–5]. Несмотря на то, что риск заражения человека субтипом А/Н5N8 остается

низким, в 2021 году во время вспышки среди домашней птицы был зарегистрирован случай выделения в числе сотрудников птицефабрики [6].

Нейраминидаза вируса гриппа – это гомотетрамерный белок, в каждом мономере которого расположен активный центр сиалидазы (рис. 1). Он сформирован из каркасных аминокислотных остатков в виде кармана и каталитических остатков, которые напрямую взаимодействуют с субстратом (10 и 8 а.о., соответственно).

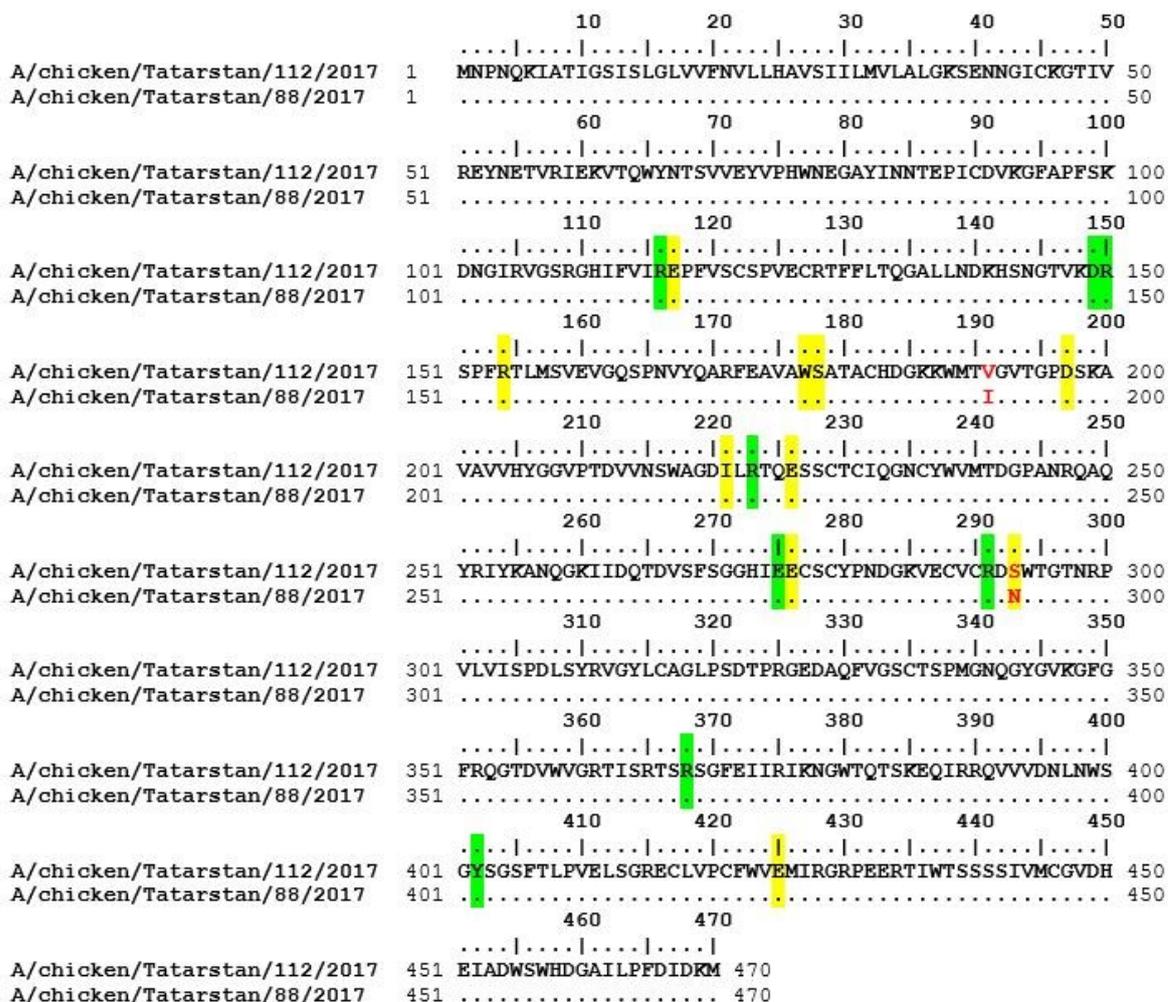


Рисунок 1. Аминокислотные последовательности нейраминидазы: зеленым цветом выделены аминокислоты, входящие в состав активного центра, желтым – в состав каркасной области

Figure 1. Amino acid sequences of neuraminidase: amino acids that make up the active center are highlighted in green, and those that make up the framework region are highlighted in yellow

Среди нейраминидаз вируса гриппа эти аминокислоты высококонсервативны и мутации в них вызывают сильный фенотипический эффект, связанный с ферментативной активностью этого белка и его восприимчивостью к лекарственным препаратам, основанной на принципе имитирования субстрата для конкурентной блокировки активного центра. Нейраминидаза N8, входит в состав филогенетической группы, объединяющей субтипы: N1, N4, N5 и N8, и способна циркулировать в составе вирусов гриппа птиц, имеющих высокопатогенный фенотип. Одной из функций нейраминидазы является высвобождение новых вирусных частиц из инфицированных клеток путем расщепления остатков сиаловой кислоты на

поверхности клеток-хозяев и вирусной оболочке. Благодаря этому предотвращается агрегация вирусных частиц, что позволяет вирусу инфицировать новые клетки. Кроме того, снижается способность связывания вируса муцинами слизистой оболочки дыхательных путей, содержащими остатки сиаловых кислот.

Применение ингибиторов нейраминидазы является одним из методов противовирусной терапии при гриппе. Ингибиторы нейраминидазы – это соединения, блокирующие активность фермента и, следовательно, препятствующие распространению вируса в организме, что способствует снижению тяжести и продолжительности заболевания. Механизм действия ингибиторов нейраминидазы основан на

связывании с активным центром фермента, что не позволяет ему в дальнейшем расщеплять сиаловую кислоту. Это приводит к снижению высвобождения вируса из инфицированных клеток, ограничению распространения вируса в дыхательных путях, а также к потенциальному уменьшению вирусной нагрузки в организме в целом. Снижая продуктивный выход вирусных частиц, ингибиторы нейраминидазы ограничивают способность зараженного индивида к контаминации окружающей среды вирусом. Как следствие, резистентность к ингибиторам нейраминидазы может приводить к повышенному риску передачи инфекции. Несмотря на эффективность одобренных на данный момент препаратов (Осельтамивир, Занамивир, Перамивир, Ланинамивир), мутации в гене нейраминидазы могут привести к снижению восприимчивости к этим ингибиторам. Мониторинг штаммов вируса гриппа на предмет резистентности к ингибиторам нейраминидазы имеет важное значение, особенно во время вспышек, поскольку лекарственная устойчивость может повлиять как на эффективность лечения, так и в целом на положительный исход заболевания. Несмотря на низкий риск заражения человека, оценка чувствительности вирусов гриппа птиц к антинейраминидазным препаратам необходима для отслеживания появления штаммов с высоким зоонозным потенциалом. Известно, что мутация N294S приводит к снижению чувствительности к ингибиторам [7; 8]. Целью данной работы было комплексное исследование *in silico*, направленное на изучение взаимодействия нейраминидазы вируса гриппа птиц A/H5N8 с занамивиром, с применением методов сравнительного моделирования и молекулярного докинга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы вируса гриппа птиц и ингибиторы: A/chicken/Tatarstan/88/2017 (дикий тип), A/chicken/Tatarstan/112/2017 (мутация N294S). Аминокислотные последовательности белка нейраминидазы взяты в базе данных GISAID (дата обращения: сентябрь 2024). В качестве ингибитора нейраминидазы использовали занамивир. Структура ингибитора взята в базе данных PubChem (CID: 60855).

Получение трехмерных структур и комплексов: трехмерная структура белка получена методом сравнительного моделирования с использованием программы MODELLER. В качестве шаблона выбрана структура из базы данных pdb (2HT5). Подготовка молекул белка и лиганда проводилась в программе AutoDock Tools. Структура комплекса нейраминидазы с занамивиром построена методом молекулярного докинга с использованием программы AutoDock Vina.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Штаммы A/chicken/Tatarstan/88/2017 и A/chicken/Tatarstan/112/2017, принадлежащие к кладе 2.3.4.4b, были выделены в России в 2017 году. По результатам предыдущих исследований была выявлена аминокислотная замена в позиции N293/294S (далее используется нумерация N8/N2; соответствие между нумерациями N8 и N2 определяется в соответствии с выравниванием, представленным в исследовании Yang H. и др. [9]) и оценена восприимчивость к занамивиру [10].

В процессе работы была отобрана модель, расположение лиганда в которой соответствует месту связывания в похожих структурах, полученных экспериментально (pdb 2HTQ) (рис. 2). Для комплекса с занамивиром ΔG полученных моделей составила -7,274 для дикого типа и -5,562 для мутантного варианта.

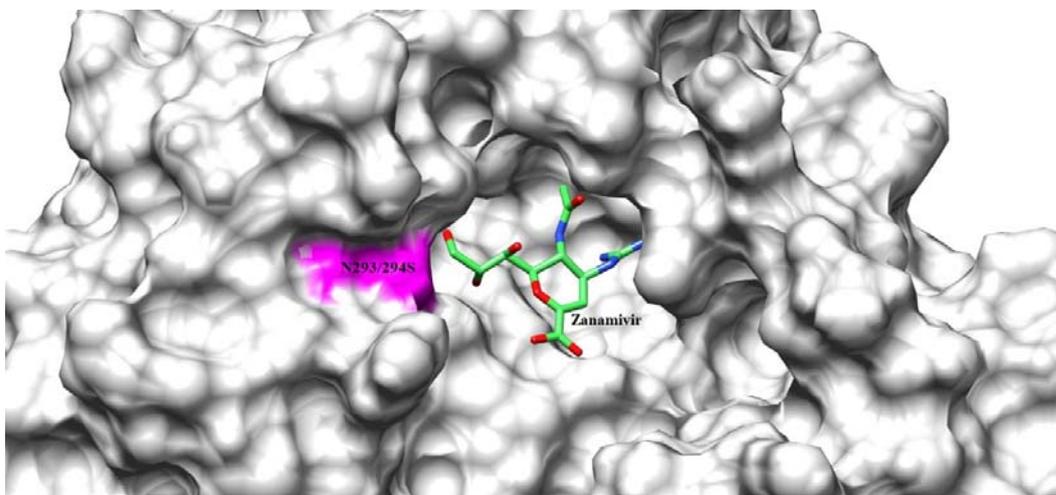


Рисунок 2. Карман связывания занамивира в активном центре нейраминидазы N8
Figure 2. Surface area of zanamivir binding pocket within the NA active site for N8 neuraminidase

Предполагаемый механизм резистентности мутантного типа нейраминидазы N8 заключается в следующем: занамивир образует связь с нейраминидазой N8 через следующие аминокислотные остатки: ARG116, ARG150, TPR177, GLU275, CLU276, ARG291, ARG368 (рис. 3). Аспарагин в 294 позиции белка дикого типа образует водородные связи с аргинином в позиции 292 активного

центра, что позволяет ему при участии аланина 246 образовать дополнительную связь с занамивиром. Таким образом атом О аспарагина может попеременно связываться с NE и NH2 группами аргинина 292, позволяя в то же время занамивиру устанавливать дополнительную связь в кармане активного центра белка через NH2-группу аргинина, тем самым стабилизируя комплекс

занамиров-нейрами-нидаза. Замена аспарагина 294 на серин белка мутантной формы исключает взаимодействие с аланином 246 и приводит к потере одной из водородных связей с аргинином 292, тем самым предотвращая образование дополнительной связи

занамиров с аргинином 292. Таким образом, стабильность комплекса занамиров-активный центр нейраминидазы снижается, что в свою очередь приводит к снижению восприимчивости штамма A/chicken/Tatarstan/112/ 2017 к занамирову.

Таблица 1. Аминокислотные остатки, участвующие в образовании внутри и межмолекулярных связей
Table 1. Amino acid residues involved in the formation of intramolecular and intermolecular bonds

A/chicken/Tatarstan/88/2017 А/курица/Татарстан/88/2017			A/chicken/Tatarstan/112/ 2017 А/курица/Татарстан/112/2017		
аминокислотный остаток amino acid residue	взаимодействие через атом interaction through the atom	Длина связи Link Length (Å)	аминокислотный остаток amino acid residue	взаимодействие через атом interaction through the atom	Длина связи Link Length (Å)
Аминокислотные остатки, участвующие в образовании связи с занамировом Amino acid residues involved in the formation of a bond with zanamivir.					
ARG118	NH1	2.423	ARG118	NH1	2.423
ARG152	NH1	3.115	ARG152	NH1	3.116
TRP178	O	3.246	TRP178	O	3.247
TRP178	O	2.963	TRP178	O	2.964
GLU276	OE1	2.713	GLU276	OE1	2.670
GLU277	OE2	2.716	GLU277	OE2	2.686
ARG371	NH1	3.101	ARG371	NH1	3.099
ARG371	NH2	3.146	ARG371	NH2	3.149
ARG292	NH1	3.434	ARG292	NH1	3.429
ARG292	NH2	3.503			
Внутримолекулярные связи с участием аминокислотного остатка 294 позиции Intramolecular bonds involving amino acid residues at position 294					
HIS274	ND1	3.061	HIS274	ND1	3.074
ALA246	O	2.765			
ARG292	NE	2.936			
ARG292	NH2	2.738			

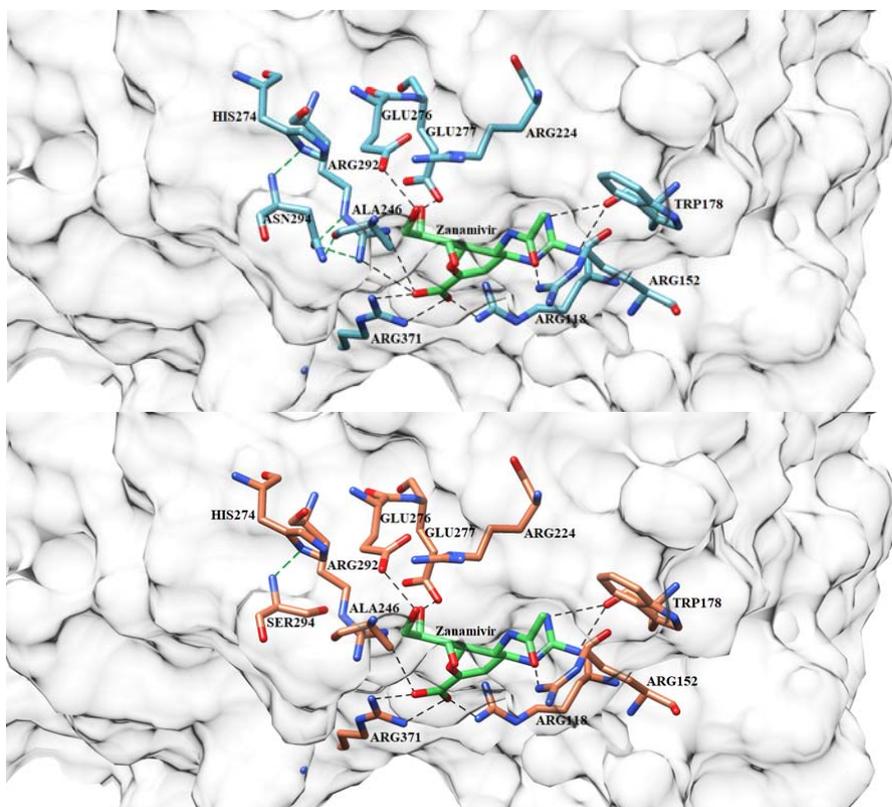


Рисунок 3. Структура комплексов нейраминидазы штаммов A/chicken/Tatarstan/88/2017 (голубой) и A/chicken/Tatarstan/112/2017 (оранжевый) и занамиров (зеленый)
Figure 3. Structure of neuraminidase complexes with zanamivir (green) for A/chicken/Tatarstan/88/2017 (blue) и A/chicken/Tatarstan/112/2017 (orange)

Для подтверждения результатов моделирования и более полной картины необходимо получать кристаллические структуры комплекса занамивира и нейраминидазы дикого типа и штамма с мутацией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для нейраминидазы штамма A/chicken/Tatarstan/88/2017 аспарагин в позиции 294 участвует в образовании комплекса с занамивиром, а его замена на серин для штамма A/chicken/Tatarstan/112/2017 может потенциально делать данный участок не активным. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что мутация в позиции 294 в гене нейраминидазы для штамма A/chicken/Tatarstan/112/2017 приводит к снижению вероятности связывания с занамивиром, вследствие чего данный штамм может проявлять устойчивость к ингибированию.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа по *in silico* моделированию выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение от 12.10.2021 № 075-15-2021-1355) в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры. Генетический анализ штаммов выполнен при поддержке гранта РФФИ №23-64-00005.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement №075-15-2021-1355) within the framework of the implementation of individual activities of the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Synchrotron and Neutron Research and Research Infrastructure. The genetic analysis of the strains was conducted with the support by state Russian Science Foundation grant №23-64-00005.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Swayne D.E., ed. Avian influenza. John Wiley & Sons, 2009.
2. Ku K.B. et al. Highly pathogenic avian influenza A (H5N8) virus from waterfowl, South Korea, 2014 // *Emerging infectious diseases*. 2014. V. 20. N 9. P. 1587.
3. Chang N. et al. Novel reassortment 2.3. 4.4 b H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses circulating in Xinjiang, China // *Preventive Veterinary Medicine*. 2022. V. 199. Article id: 105564.
4. Lee D.H. et al. Novel reassortant clade 2.3. 4.4 avian influenza A (H5N8) virus in wild aquatic birds, Russia, 2016 // *Emerging Infectious Diseases*. 2017. V. 23. N 2. P. 359.
5. Zhao K. et al. Characterization of three H5N5 and one H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in China // *Veterinary microbiology*. 2013. V. 163. N 3-4. P. 351–357.
6. Pyankova O.G. et al. Isolation of clade 2.3. 4.4 b A (H5N8), a highly pathogenic avian influenza virus, from a worker during an outbreak on a poultry farm, Russia,

КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Все авторы внесли вклад в концепцию исследования. Галина С. Онхонова написала первый черновик рукописи, все авторы прочитали, прокомментировали и

December 2020 // *Eurosurveillance*. 2021. V. 26. N 24. Article id: 2100439.

7. Earhart K.C. et al. Oseltamivir resistance mutation N294S in human influenza A(H5N1) virus in Egypt // *J Infect Public Health*. 2009. V. 2. N. 2. P. 74–80. doi:10.1016/j.jiph.2009.04.004
8. Collins P. et al. Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants // *Nature*. 2008. V. 453. P. 1258–1261. <https://doi.org/10.1038/nature06956>
9. Yang H. et al. Molecular characterizations of surface proteins hemagglutinin and neuraminidase from recent H5Nx avian influenza viruses // *Journal of virology*. 2016. V. 90. N 12. P. 5770–5784.
10. Svyatchenko S.V. et al. An influenza A (H5N8) virus isolated during an outbreak at a poultry farm in Russia in 2017 has an N294S substitution in the neuraminidase and shows reduced susceptibility to oseltamivir // *Antiviral Research*. 2021. V. 191. Article id: 105079.

REFERENCES

1. Swayne D.E., ed. Avian influenza. John Wiley & Sons, 2009.
2. Ku K.B. et al. Highly pathogenic avian influenza A (H5N8) virus from waterfowl, South Korea. *Emerging infectious diseases*. 2014, vol. 20, no. 9, p. 1587.
3. Chang N. et al. Novel reassortment 2.3. 4.4 b H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses circulating in Xinjiang, China. *Preventive Veterinary Medicine*. 2022, vol. 199, article id: 105564.
4. Lee D.H. et al. Novel reassortant clade 2.3. 4.4 avian influenza A (H5N8) virus in wild aquatic birds, Russia, 2016. *Emerging Infectious Diseases*. 2017, vol. 23, no. 2, p. 359.
5. Zhao K. et al. Characterization of three H5N5 and one H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in China. *Veterinary microbiology*. 2013, vol. 163, no. 3-4, pp. 351–357.
6. Pyankova O.G. et al. Isolation of clade 2.3. 4.4 b A (H5N8), a highly pathogenic avian influenza virus, from a worker during an outbreak on a poultry farm, Russia, December 2020. *Eurosurveillance*. 2021, vol. 26, no. 24, article id: 2100439.
7. Earhart K.C. et al. Oseltamivir resistance mutation N294S in human influenza A(H5N1) virus in Egypt. *J Infect Public Health*, 2009, vol. 2, no. 2, pp. 74–80. doi:10.1016/j.jiph.2009.04.004
8. Collins P., et al. Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants. *Nature*, 2008, vol. 453, pp. 1258–1261. <https://doi.org/10.1038/nature06956>
9. Yang H. et al. Molecular characterizations of surface proteins hemagglutinin and neuraminidase from recent H5Nx avian influenza viruses. *Journal of virology*, 2016, vol. 90, no. 12, pp. 5770–5784.
10. Svyatchenko S.V. et al. An influenza A (H5N8) virus isolated during an outbreak at a poultry farm in Russia in 2017 has an N294S substitution in the neuraminidase and shows reduced susceptibility to oseltamivir. *Antiviral Research*, 2021, vol. 191, article id: 105079.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the concept of the study. The first draft of the manuscript was written by Galina S. Onkhonova, and all authors read, commented on and approved the final

одобрили окончательную рукопись. Елена А. Рухлова проводила *in silico* моделирование и анализ полученных структур. Елена А. Рухлова, Галина С. Онхонова, Максим Н. Косенко интерпретировали результаты исследования. Иван М. Суслопаров, Иван А. Соболев, Александр Б. Рыжиков рецензировали и редактировали рукопись. Все авторы в равной степени участвовали в написании рукописи и несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата или других неэтических проблем.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

manuscript. Elena A. Rukhlova conducted *in silico* modeling and analysis of the obtained structures. Galina S. Onkhonova, Elena A. Rukhlova, Maxim N. Kosenko interpreted the results of the study. Ivan M. Susloparov, Ivan A. Sobolev, Alexander B. Ryzhikov reviewed and edited the manuscript. All authors participated equally in the writing of the manuscript and are responsible for plagiarism, self-plagiarism or other ethical transgressions.

NO CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Елена А. Рухлова / Elena A. Rukhlova <https://orcid.org/0000-0002-3465-4577>

Галина С. Онхонова / Galina S. Onkhonova <https://orcid.org/0000-0002-1547-1708>

Максим Н. Косенко / Maksim N. Kosenko <https://orcid.org/0000-0002-8023-0601>

Иван М. Суслопаров / Ivan M. Susloparov <https://orcid.org/0000-0002-9718-7339>

Иван А. Соболев / Ivan A. Sobolev <https://orcid.org/0000-0002-4561-6517>

Александр Б. Рыжиков / Alexander B. Ryzhikov <https://orcid.org/0000-0002-7009-0748>