



БОЛЬШИЕ ВЫЗОВЫ

ВСЕРОССИЙСКИЙ КОНКУРС
НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЕКТОВ



Региональный трек
Всероссийского конкурса
научно-технологических проектов

«БОЛЬШИЕ ВЫЗОВЫ»

направление

Генетика, персонализированная и прогностическая
медицина

название работы

Поиск ингибиторов
РНК-полимеразы
метапневмовируса методом
молекулярного докинга

участник(и)

Артамонова Екатерина Андреевна

#большиевызовы
#МГК

mgk.olimpiada.ru

г. Москва
2021

Актуальность

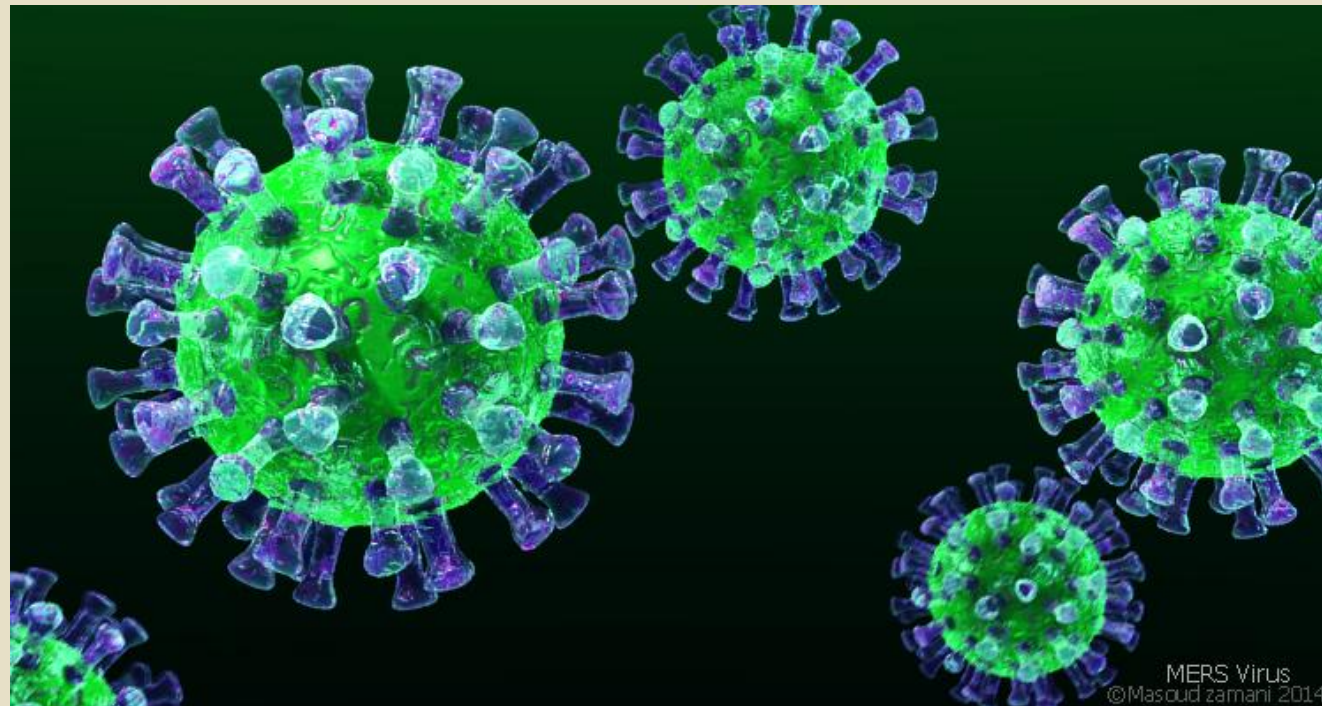
- Метапневмовирус человека является самой распространенной причиной ОРВИ у детей .
- На сегодняшний день не существует специфичного препарата против метапневмовируса .
- Большинство препаратов, ингибирующих вирусные ферменты , обладает высокой токсичностью.
- Растения семейства Розоцветные широко применяются в качестве лекарств и обладают малой токсичностью.
- Идея нашего проекта состояла в том , чтобы найти растительное вещество, которое помогло бы бороться с метапневмовирусом человека.

Используемые термины

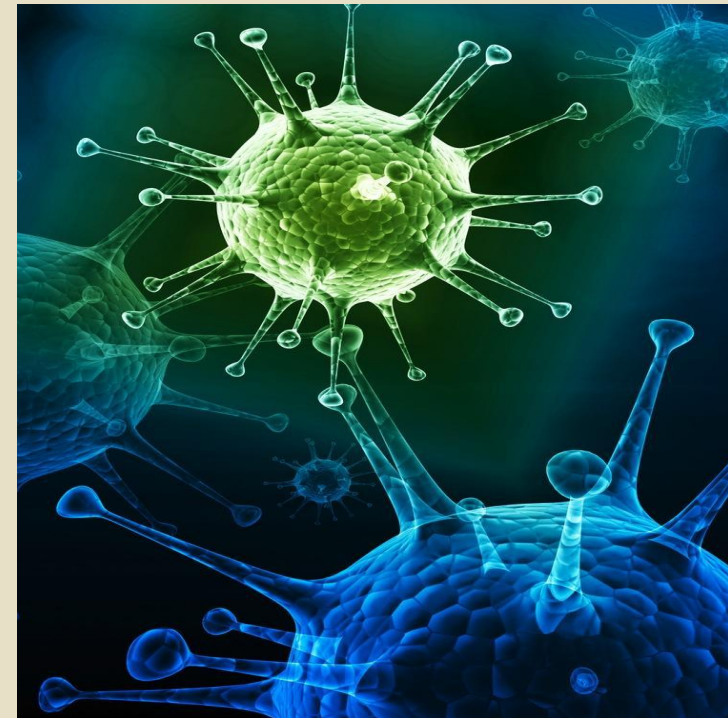
- Вирусы— неклеточные формы жизни, обладающие собственным геномом и способные к воспроизведению лишь в клетках более высокоорганизованных существ.
- Докинг – компьютерное моделирование связывания веществ .
- Рецептор — в данном случае: молекула фермента, на которую проводится докинг.
- Лиганд- в данном случае : малая молекула, докинг которой проводится на рецептор .
- Ингибитор — вещество, замедляющее протекание ферментативной реакции.
- Фермент – это **биологический катализатор**, который облегчает протекание химической реакции и за счет этого увеличивает её скорость.

Разнообразие вирусов

- Коронавирус – возбудитель MERS (ближневосточного респираторного синдрома)

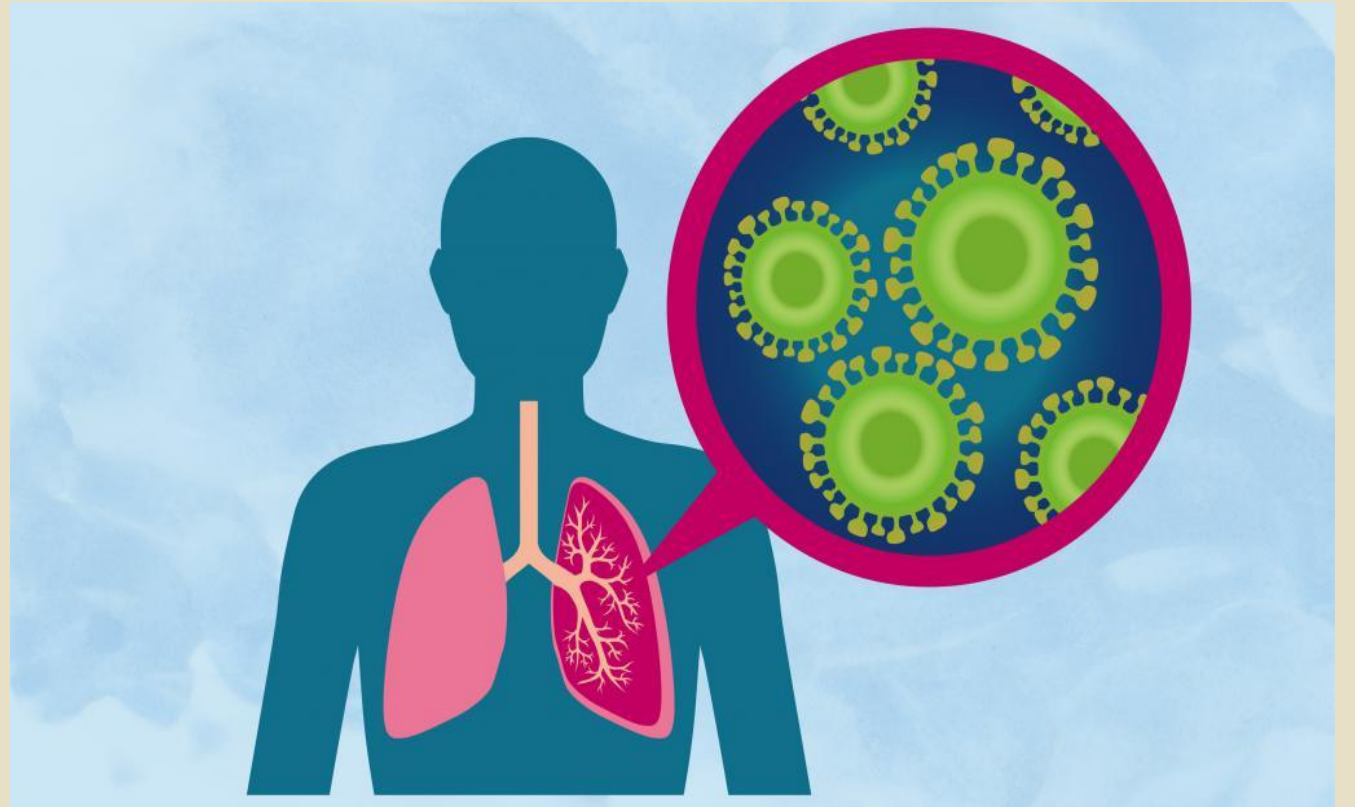


- Вирус гриппа

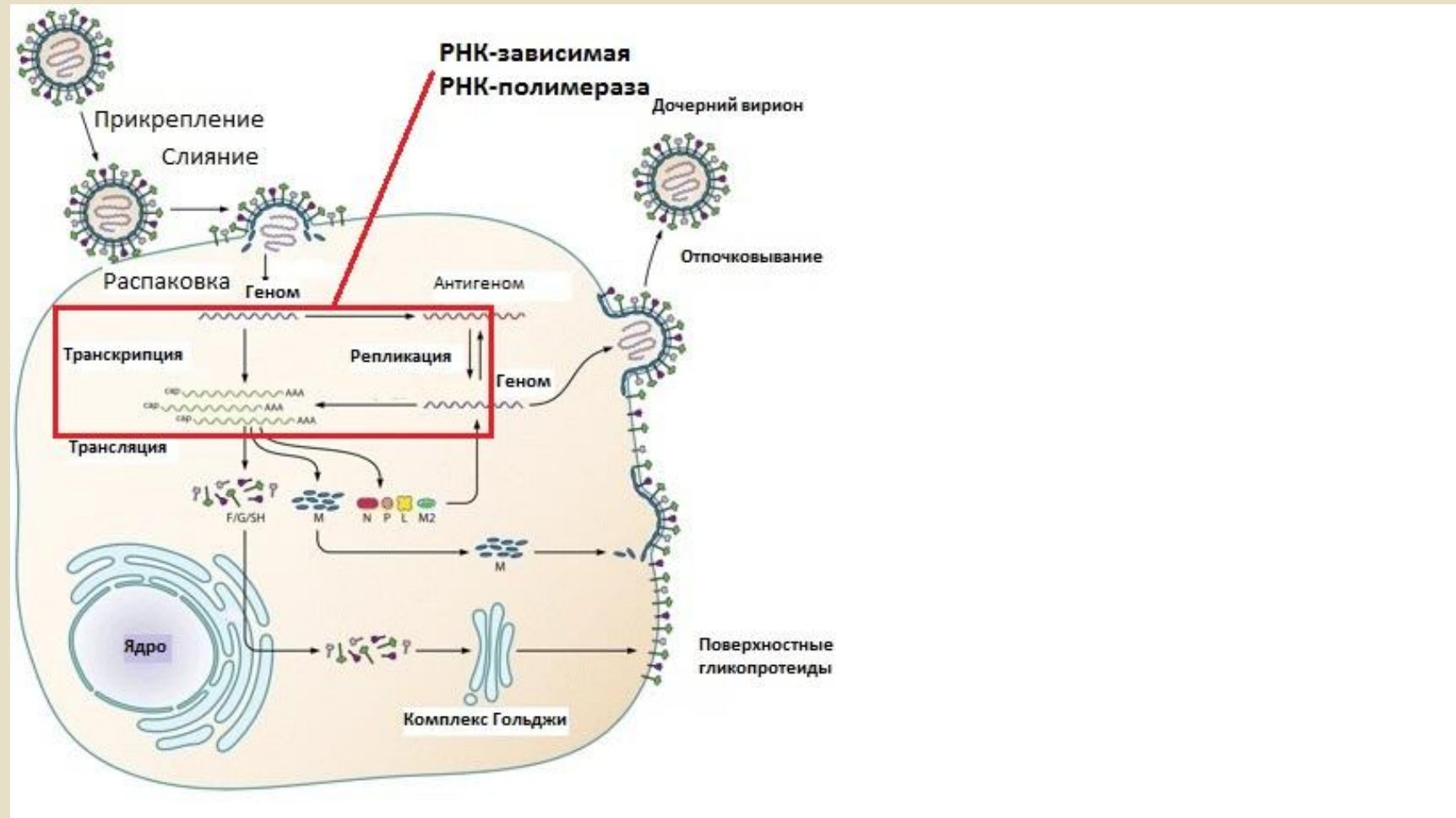


Метапневмовирус человека

- Вид РНК-содержащих вирусов ,вызывает ОРВИ у человека, преимущественно у детей.
- Семейство: Paramyxoviridae (Парамиксовирусы).
- Род: Metapneumovirus (метапневмовирус).
- Открыт в 2001г.



Жизненный цикл метатневмовируса



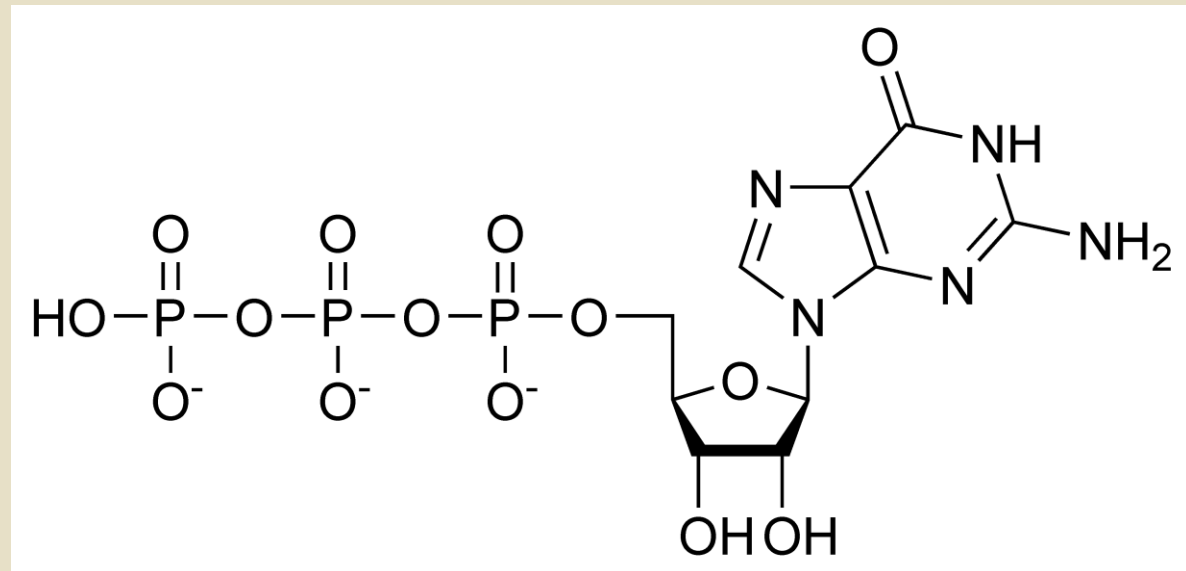
Ключевой фермент метатневмовируса.

- РНК-зависимая РНК-полимераза: синтез РНК на матрице РНК.
- Осуществляет транскрипцию и репликацию.
- Известна 3D-структура части РНК-зависимой РНК-полимеразы (PDB ID: 4UCZ).

РНК-полимераза 4UCZ



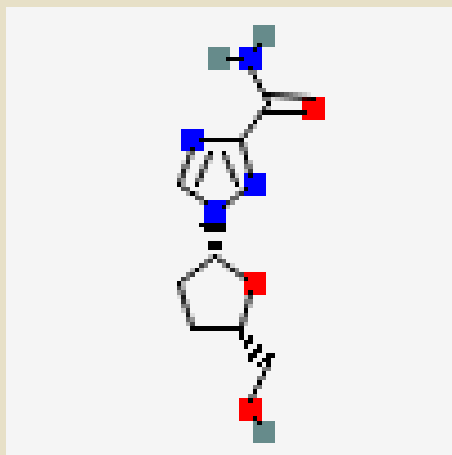
Субстрат: ГТФ



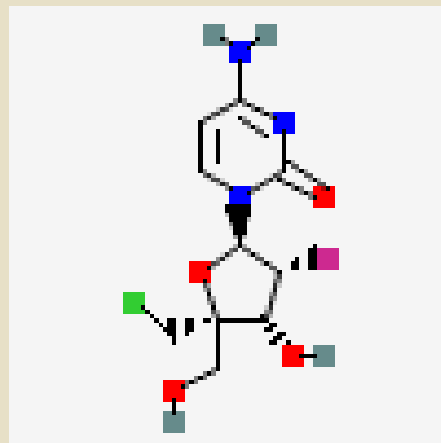
Ингибиторы вирусных ферментов

- Антиметаболиты (нуклеозидные аналоги):

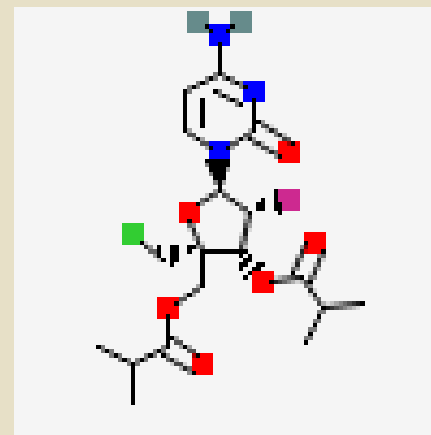
Рибавирин



2'-фтор-4'-хлорметилцитидин
(ALS-8112).



Люмицитабин
(ALS-8176).



Цель работы

- Исследовать потенциальные ингибиторы вирусных ферментов в растениях .
- *(Возможна меньшая токсичность по сравнению с существующим ингибиторами).*

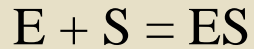
Задача проекта

Поиск потенциальных ингибиторов РНК-зависимой РНК-полимеразы в растениях Московской области из семейства Розоцветные.

Энергия и константа связывания веществ с ферментом

- -Необходимо связывание с РНК-зависимой РНК-полимеразой в том же месте, что и ГТФ/ГМФ.
- -Энергия связывания должна быть как можно ниже, желательно ниже, чем энергия связывания субстратов.

Смысл константы связывания:



$K = [E][S]/[ES]$, размерность – моль/л

При $[S] = K$

$[E] = [ES]$ – концентрация свободного фермента равна концентрации фермент-субстратного комплекса

(50% молекул фермента связано с субстратом)

$$K = e^{\Delta G/RT}$$

ΔG – энергия Гиббса связывания, Дж/моль

$R = 8,314$ Дж/(моль К) – универсальная газовая постоянная

T – температура, К

(310 К – температура тела человека)

Дизайн исследования

- - Выбор растений для литературного поиска: floralib.msk.ru
- - Поиск литературы об активных соединениях выбранных растений: GoogleScholar – запросы общего вида “*Genus species active compounds*”; “*Genus species active components*”; “*Genus species chemical composition*”, где Genus – родовое название, species – видовое название.
- - Составление списка активных соединений (химических названий)
- - Скачивание трёхмерных координатных файлов искомых соединений из базы данных PubChem;
- - Скачивание трёхмерных координатных файлов РНК-зависимой РНК-полимеразы из базы данных Protein Data Bank (ID: 4UCZ)
- - Работа в PyMol: определение центров масс лигандов (ГТФ и ГМФ); удаление лигандов из координатного файла; сохранение координатных файлов субъединиц; преобразование файлов соединений из .sdf в .pdb;
- - Работа в AutodockTools: подготовка файлов для докинга – добавление атомов водорода, зарядов атомов, сохранение в PDBQT-формате.
- - Молекулярный докинг в Autodock Vina
- - Отбор перспективных веществ среди исследованных соединений

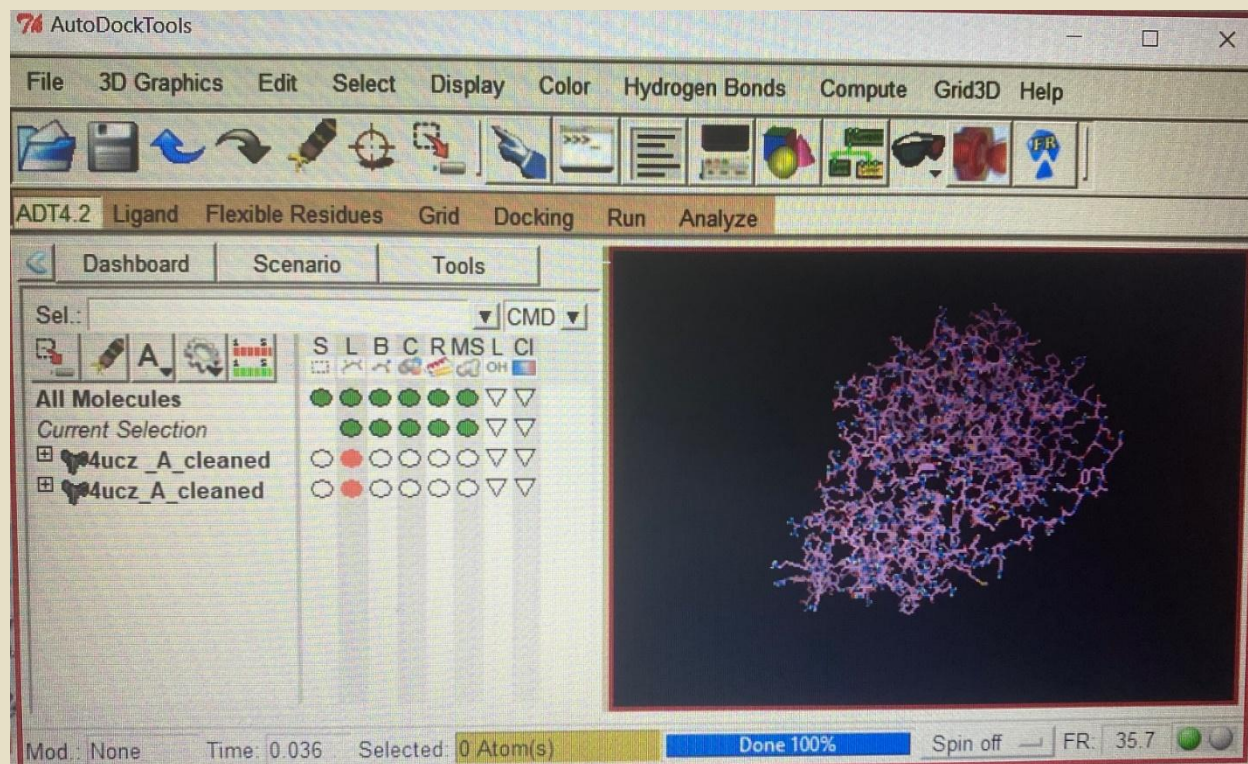
Выбор растений (семейство Розоцветные)

- Род *Geum*: *Geum rivale*- Гравилат речной, *Geum urbanum*- Гравилат городской
- Род *Potentilla*: *Potentilla erecta*- Лапчатка прямостоячая (Калган), *Potentilla anserina*- Лапчатка гусиная,*Potentilla norvegica* -Лапчатка норвежская , *Potentilla arenaria* -Лапчатка песчаная, *Potentilla argentea* -Лапчатка серебристая,
- Род *Filipendula*: *Filipendula vulgaris*-Лабазник обыкновенный(таволга), *Filipendula ulmaria*- Лабазник вязолистый (таволга вязолистая) .

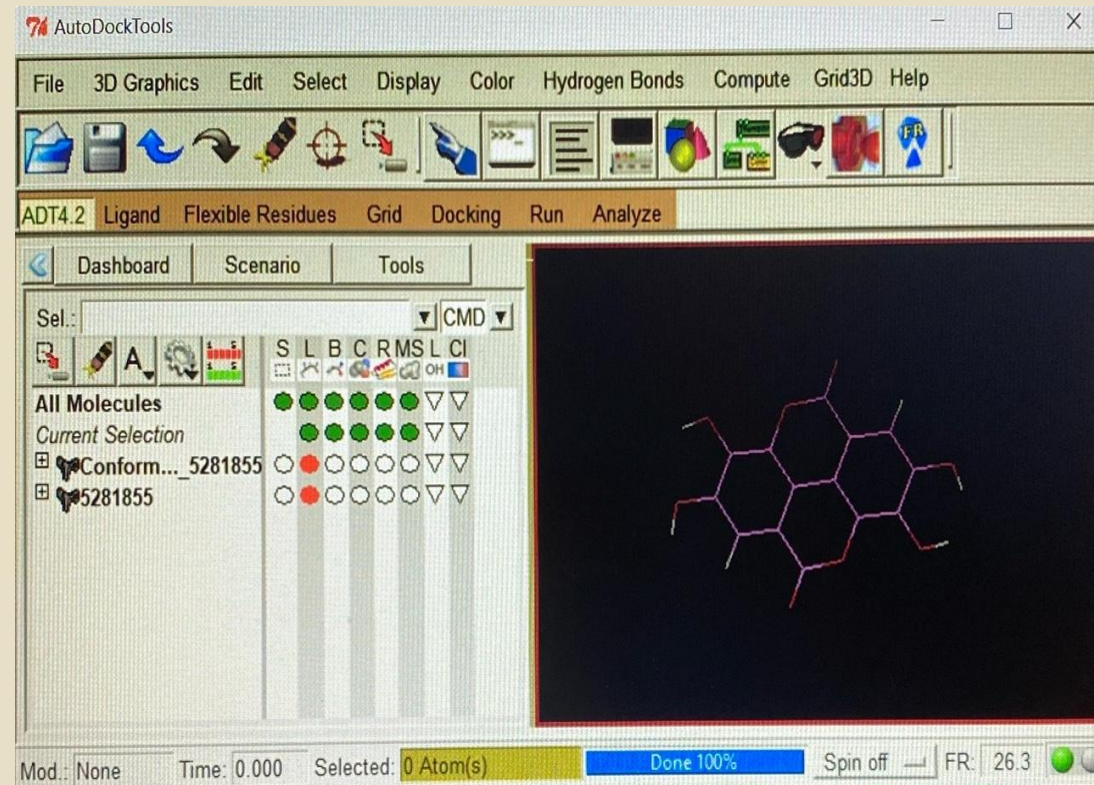
Активные соединения: гравилат речной

- Gallic acid 370
- Protocatechuic acid 72
- P-Hydroxybenzoic acid 135
- Vanillic acid 8468
- Caffeic acid 689043
- Syringic acid 10742
- P-Coumaric acid 637542
- Ferulic acid 445858
- Sinapic acid 637775
- Ellagic acid 5281855
- Salicylic acid 338
- В гравилате речном содержатся следующие соединения, мы провели докинг этих веществ в РНК-полимеразу.

Подготовка рецептора



Подготовка лиганда



Работа докинговой программы: 5-20 минут на вещество.

```
C:\WINDOWS\system32\cmd.exe
C:\Users\Asus\Desktop\Docking_Antamono...>vina.exe --receptor 4ucz_A_cleaned.pdbqt --ligand 5281855.pdbqt --center_x 25 --center_y -11 --center_z -48 --size_x 30 --size_y 30 --size_z 30 --exhaustiveness 8 --out 5281855_4ucz_A_cleaned_30ex8.pdbqt --log 5281855_4ucz_A_cleaned_30ex8.log
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:
#
# O. Trott, A. J. Olson,
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking
# with a new scoring function, efficient optimization and
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)
# 455-461
#
# DOI 10.1002/jcc.21334
#
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.
#####
Detected 4 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -1077361256
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
*****
```

```
Файл Правка Формат Вид Справка
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:
#
# O. Trott, A. J. Olson,
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking
# with a new scoring function, efficient optimization and
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)
# 455-461
#
# DOI 10.1002/jcc.21334
#
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.
#####
Detected 4 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -1077361256
Performing search ... done.
Refining results ... done.

mode | affinity | dist from best mode
      | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----+-----+-----+-----
1      -8.4      0.000      0.000
2      -8.4      8.303      11.000
3      -8.4      8.305      10.600
4      -8.0      6.748      9.652
5      -7.9      8.925      10.602
6      -7.6      3.678      7.352
7      -7.6      2.380      4.122
8      -7.6      2.756      6.196
9      -7.6      7.798      10.592

Writing output ... done.
```

Докинг активных фенольных соединений из гравилата речного

Название вещества	Идентификатор PubChem	Энергия связывания, ккал/моль	Константа связывания, мкмоль/л
Галловая кислота	370	-6.1	50.044
Протокатеховая к-та	72	-6.1	50.044
Пара-гидроксibenзойная к-та	135	-6.2	42.545
Ванильная кислота	8468	-5.9	69.240
Кофейная кислота	689043	-6.5	26.142
Сиреневая кислота	10742	-6.1	50.044
Паракумаровая к-та	637542	-6.3	36.170
Феруловая кислота	445858	-6.4	30.750
Синаповая кислота	637775	-6.4	30.750
Салициловая кислота	338	-6.1	50.044
Эллаговая кислота	5281855	-8.2	1.655

Докинг субстратов РНК-полимеразы (цепь A/цепь B)

Субстрат	Энергия связывания кКал/моль	Константы связывания мкмоль/л
АТФ	-8.5 / -8,4	1.017/1.196
ГТФ	-9.1/ -8,8	0.384/ 0.625
УТФ	-8.7 / -8,3	0.735/ 1.407
ЦТФ	-8.8 / -8,2	0.625 / 1.655

Эллаговая кислота: ВОЗМОЖНЫЙ КЛЮЧ К РНК-полимеразе?

- Связывание эллаговой кислоты с РНК-полимеразой сравнимо с субстратами РНК-полимеразы
- Возможно, производные эллаговой кислоты (в частности, гликозиды) будут обладать более сильным сродством к ферменту?
- В базе данных PubChem по запросу «ellagic acid» было обнаружено 14 соединений, в частности, гликозиды.
- Был проведён докинг этих соединений с РНК-зависимой РНК-полимеразой метапневмовируса. (среднее время докинга- 15-20 минут на вещество).

Докинг производных эллаговой кислоты (15-20 минут/соединение/цепь)

ID Pubchem	102390018	133322358	5318135	10951064	102148497	54004380	101129363	101757027	53304703	101757026	101949535	10026656	78384860	10838304
ЭНЕРГИЯ СВЯЗЫВАНИЯ ЦЕПЬ А кКал/моль	-9.1	-8.5	-11.9	-9.5	-11.0	-9.9	-10.0	-10.3	-8.9	-10.4	-10.4	-10.3	-10.4	-9.0
ЭНЕРГИЯ СВЯЗЫВАНИЯ ЦЕПЬ В кКал/моль	-8.7	-8.4	-10.4	-9.3	-10.8	-9.7	-10.2	-10.1	-9.0	-9.7	-9.7	-10.8	-9.7	-9.3
Константы связ. А, мкмоль/л	0.38395	1.0169	0.00407	0.20057	0.01756	0.10477	0.0890746	0.054732	0.53122	0.046531	0.0465311	0.054732	0.046531	0.45162
Константы связывания	0.73499	1.196	0.046531	0.27750	0.024307	0.14496	0.064379	0.075727	0.45162	0.14496	0.14496	0.024307	0.14496	0.27750

Перспективные производные эллаговой кислоты

Идентификатор	Название	Энергия связывания, ккал/моль (цепь А / цепь В)	Константа связывания, нмоль/л (цепь А / цепь В)	Вст речается в растениях
5318135	2-О-(6-О-бета-D-глюкопиранозил-бета-D-глюкопиранозил)эллаговая кислота	-11.9/-10.4	4.07/46.5	<i>Filipendula ulmaria</i> (таволга вязолистная), <i>Potentilla anserina</i> (лапчатка гусиная)
102148497	Эллаговой кислоты 2-О-(6-О-альфа-L-рамнопиранозил-бета-D-глюкопиранозид)	-11.0/-10.8	17.6/24.3	<i>Filipendula ulmaria</i> (таволга вязолистная), <i>Potentilla anserina</i> (лапчатка гусиная)
101129363	Эллаговой кислоты 4-ацетиларабинозид	-10.0/-10.2	89.07/64.38	<i>Geum rivale</i> (гравилат речной); <i>Rubus idaeus</i> (малина), <i>Vitis rotundifolia</i> (виноград круглолистный)
101757027	Эллаговой кислоты 4-ацетилксилозид	-10.3/-10.1	54.7/75.7	<i>Geum rivale</i> (гравилат речной), <i>Geum urbanum</i> (гравилат городской)

Выводы.

- Производные эллаговой кислоты (содержатся в семействе Розоцветные) в проведённых вычислениях показали способность связываться с субстрат-связывающим доменом РНК-зависимой РНК-полимеразы метапневмовируса человека с очень низкими значениями энергий и констант связывания (менее -10 ккал/моль, менее 89,07 нмоль/л). Для сравнения, наиболее сильное связывание субстрата (ГТФ) характеризуется энергией -8,8 ккал/моль, что соответствует константе связывания 531,2 нмоль/л.
- Возможно, исследованные вещества окажутся применимы в качестве лекарственных средств против метапневмовирусной инфекции.

Спасибо за внимание!

