

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.322

Молекулярное моделирование HR2- и трансмембранного доменов префузионного S-белка вируса SARS-CoV-2**М.Е. Боздаганян^{1,2} , Ф.С. Орехов^{1,3} , Д.С. Литвинов¹, В.Н. Новоселецкий^{1,*} **¹*Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семенова, Российская академия наук, Россия, 119991, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4;*³*Институт персонализированной медицины, Сеченовский университет, Россия, 119435, г. Москва, Большая Пироговская ул., д. 2, стр. 4***e-mail: novoseletsky@mail.bio.msu.ru*

Вирус SARS-CoV-2, вызывающий короновиральную инфекцию COVID-19, остается в фокусе исследований по всему миру. Проникновение этого вируса в клетку начинается со связывания его S-белка с ангиотензин-превращающим ферментом 2, экспрессированным на клеточной поверхности. Изучение пространственной структуры S-белка необходимо для понимания молекулярных аспектов его функционирования. В настоящее время экспериментальными методами хорошо изучено строение почти всей молекулы S-белка, за исключением его эндодомена, трансмембранного домена и прилегающих к нему остатков эктодомена. В работе выполнено молекулярное моделирование структуры фрагмента S-белка, соответствующего его суперспиральному HR2-домену и полностью пальмитоилированному трансмембранному домену. Стабильность модели подтверждена расчетами молекулярной динамики в полноатомном и крупнозернистом представлении в липидном бислое. Показано, что пальмитоилирование приводит к существенному снижению подвижности трансмембранного домена и локальному утолщению бислоя. Это может иметь значение для процесса тримеризации белка.

Ключевые слова: молекулярное моделирование, SARS-CoV-2, S-белок, липидный бислой, пальмитоилирование, тримерная супер-спираль

Продолжающаяся пандемия COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, вступила в фазу третьей волны. Во всем мире предпринимаются усилия по разработке вакцин и лекарств для преодоления общемирового кризиса. Основной мишенью большинства вакцин является поверхностный S-белок вируса, играющий ключевую роль в проникновении вирусных частиц в клетки хозяина за счет связывания с человеческим ангиотензин-превращающим ферментом 2 (АПФ2).

S-белок состоит из двух субъединиц – S1 и S2, которые расщепляются по сайту Arg685-Ser686 клеточной фуриновой протеазой. Субъединица S1 содержит сигнальный пептид, N-концевой домен и рецептор-связывающий домен, которые взаимодействуют с АПФ2-рецептором. Субъединица S2 включает пептид слияния, гептадные повторы 1 и 2 (HR1 и HR2), трансмембранный домен (ТМД) и эндодомен. Полноразмерный мембранный S-белок, пространственная структура которого до настоящего момента не установлена, образует гомотримерный комплекс и обеспечивает слияние мембран хозяина и вирусной частицы, а впоследствии и проникновение вируса [1].

Огромный объем структурной информации доступен для эктодомена S-белка – первичной мишени иммунной системы, но гораздо меньше известно о его ТМД и проксимальных участках вблизи мембраны [2]. Считается, что конформационная подвижность S-белка преимущественно обусловлена изгибами в нескольких шарнирных областях, одной из которых является участок между HR2 и ТМД [3]. Поскольку конформационная подвижность играет ключевую роль в процессе проникновения вируса, а также может влиять на доступность эпитопов антител на поверхности S-белка, построение аккуратной модели фрагмента S-белка, включающего ТМД и соседние домены, является важной задачей.

В настоящем исследовании мы построили структурную модель фрагмента S-белка, содержащую ТМД и прилегающие к нему домен HR2 с внешней стороны мембраны и фрагмент эндодомена с ее внутренней стороны, включая домен, обогащенный цистеинами (cys). Методами молекулярной динамики (МД) в модельной мембране сложного состава в полноатомном и крупнозернистом представлении мы оптимизировали

построенную модель и оценили влияние пальмитоилирования цистеинов на подвижность S-белка в мембране и его локальное липидное окружение.

Материалы и методы

Сборка и параметризация полноатомной модели. Модель структуры фрагмента S-белка коронавируса SARS CoV-2 (включающего остатки 1157–1256, т.е. домен HR2, ТМД и домен cys) с канонической последовательностью (Uniprot P0DTC2) построена с помощью программы Modeller [4] на основании гомологии по шаблонам двух структур с кодами PDB 2fxp [5] и 6e8w [6].

Протокол полноатомной молекулярной динамики. Подготовка модели к проведению расчета МД выполнена с помощью веб-сервиса CHARMM-GUI [7], причем остатки цистеина 1235, 1236, 1241, 1242, 1244, 1248, 1249, 1251, 1254, 1255 были пальмитоилированы (рис. 1, А). Липидный состав мембраны был выбран, как описано ранее [8]: холестерин : пальмитоилсфингомиелин (ПСМ) : пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (ПОФЭ) : дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (ДПФЭ) : пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (ПОФХ) : пальмитоилолеоилфосфатидилсерин (ПОФС) : дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) : дипальмитоилфосфатидилсерин (ДПФС) как 15:10:9:6:3:3:2:2. Финальное соотношение молекул липидов после пальмитоилирования составило 88:54:51:36:18:18:12:11 соответственно. Общий размер системы с учетом молекул воды (модель TIP3P) и ионов Na⁺ и Cl⁻ (0,15 М) составил 176246 атомов. Размер ячейки составил 90Å×90Å×215Å. Минимизация энергии системы и уравнивание были выполнены по протоколу, рекомендуемому веб-сервисом CHARMM-GUI, а именно: 1) минимизация методом наискорейшего спуска длительностью 5000 шагов; 2) шесть стадий уравнивания длительностью 150–250 пс с заданием скоростей атомов в начальный момент времени в соответствии с распределением Максвелла при 318 К и с постепенным ослаблением гармонических ограничений на положение тяжелых атомов. Расчет МД выполнен с помощью программы Gromacs [9] в полноатомном силовом поле CHARMM36m [10] в ансамбле NPT при температуре 318 К в течение 30 нс.

Параметризация крупнозернистой модели и протокол крупнозернистой молекулярной динамики. Начальные модели для расчетов крупнозернистой МД с применением силового поля MARTINI 2.2 [11] были созданы с помощью сценария martinize.py на базе собранной полноатомной модели. Для пальмитоилирования белка использовался программный сценарий, доступный по адресу <https://github.com/porekhov/palmitoylize>. Молекулярная топология для пальмитоилированного остатка цистеина была взята из ранее

опубликованной работы группы Тильмана [12]. Модели пальмитоилированного и непальмитоилированного тримера были погружены в модельный бислой, аналогичный по составу использованному в полноатомных расчетах, и сольватированы (использовалась стандартная модель для воды в поле MARTINI и ионы Na⁺ и Cl⁻ в концентрации 0,15 М) с помощью сценария insane.py. Протокол МД был выбран в соответствии с рекомендациями из работы группы Марринка [13]; расчеты проводились в NPT-ансамбле при температуре 318 К. Шаг интегрирования был выбран равным 20 фс. Для обеих систем были получены траектории длиной 1 мкс. Расчеты также проводились в Gromacs 2019.4 [9]. Для расчета толщины бислоя и площади, приходящейся на липид, использовалась программа g_lompergo [14]. Для расчета радиальных функций распределения использовались сценарии Python, использующие библиотеку MDAAnalysis.

Результаты и обсуждение

Построение модели. Моделируемый фрагмент S-белка состоит из нескольких сегментов с разной степенью структурной упорядоченности (рис. 1, А). Моделирование домена HR2 не представляет затруднений, поскольку известна структура аналогичного домена близкородственного S-белка коронавируса SARS-CoV (идентичность по остаткам 1157–1210 составляет 100%) (PDB ID 2fxp, [5]). Спирали мономеров ориентированы таким образом, что к сердцевине этого домена направлены гидрофобные остатки I1172, I1179, L1186, L1193, L1200.

В то же время для ТМД S-белка в настоящее время нет шаблонов с высокой идентичностью, поэтому, исходя из тримерного α -спирального строения и обогащенности N-конца ТМД ароматическими остатками, в качестве шаблона нами был выбран ТМД оболочечного белка gp41 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) (идентичность по остаткам 1211–1240 составляет 20%, в т.ч. 33% по остаткам 1211–1225, и 7% по остаткам 1226–1240). На данный момент известно несколько заметно различающихся структур этого домена или его фрагментов (PDB ID 6e8w [6], 5jyn [15], 6b3u [16]), что делает затруднительным выбор одной из них в качестве шаблона. Кроме того, неопределенной остается конформация остатков 1205–1210, поскольку соответствующие остатки шаблона имеют неупорядоченную структуру. Одной из возможных конформаций является α -спираль, и в этом случае HR2-домен и ТМД составляли бы единую суперспираль [3]. Однако такая конформация оказывается стерически невыгодной, поскольку многочисленные ароматические остатки в последовательности S-белка оказываются расположенными со всех сторон α -спиралей и таким образом затрудняют их супер-

спирализацию. В итоге мы остановили свой выбор на шаблоне be8w, хотя и имеющем необычную для ТМД структуру [6] с изломом в α -спиралях и протяженными 3–10-спиралями, зато позволяющем расположить объемные боковые цепи ароматических остатков без перекрываний и нарушения винтовой симметрии суперспирали. На оси суперспирали при этом оказываются остатки Y1209, I1216, G1223, V1230, M1237. Построенная в данном исследовании модель (рис. 1, А; слева) ТМД S-белка коронавируса SARS CoV-2 демонстрирует заметное локальное сходство со структурой фрагмента S-белка коронавируса SARS-CoV (PDB ID 2gun), полученной ранее [17]. Отклонение по С-атомам 11 центральных остатков составляет менее 1 Å, и многие боковые цепи имеют близкую ориентацию.

Вопрос пальмитоилирования вирусных мембранных белков изучается уже около 40 лет [18].

В настоящее время принято считать, что пальмитоилированию подвергаются практически все остатки цистеина на С-конце ТМД и в cys-домене S-белка коронавируса, включая SARS-CoV [19]. По этой причине представляется неоправданным сделанный в работе Бу с соавт. [8] выбор структуры плексина (PDB ID 515k), также обогащенного остатками цистеина, связанными большим числом дисульфидных связей, в качестве шаблона для моделирования cys-домена S-белка коронавируса SARS-CoV-2. При построении нашей модели мы исходили из того, что все остатки цистеина (по 10 в каждой цепи) пальмитоилированы. Итоговая структура модели показана на рис. 1, А (слева).

Полноатомная молекулярная динамика. Выбор силового поля CHARMM36m обусловлен его широким применением для изучения динамики как белков со слабоупорядоченными областями, так и для белок-мембранных систем [10]. Кроме того,

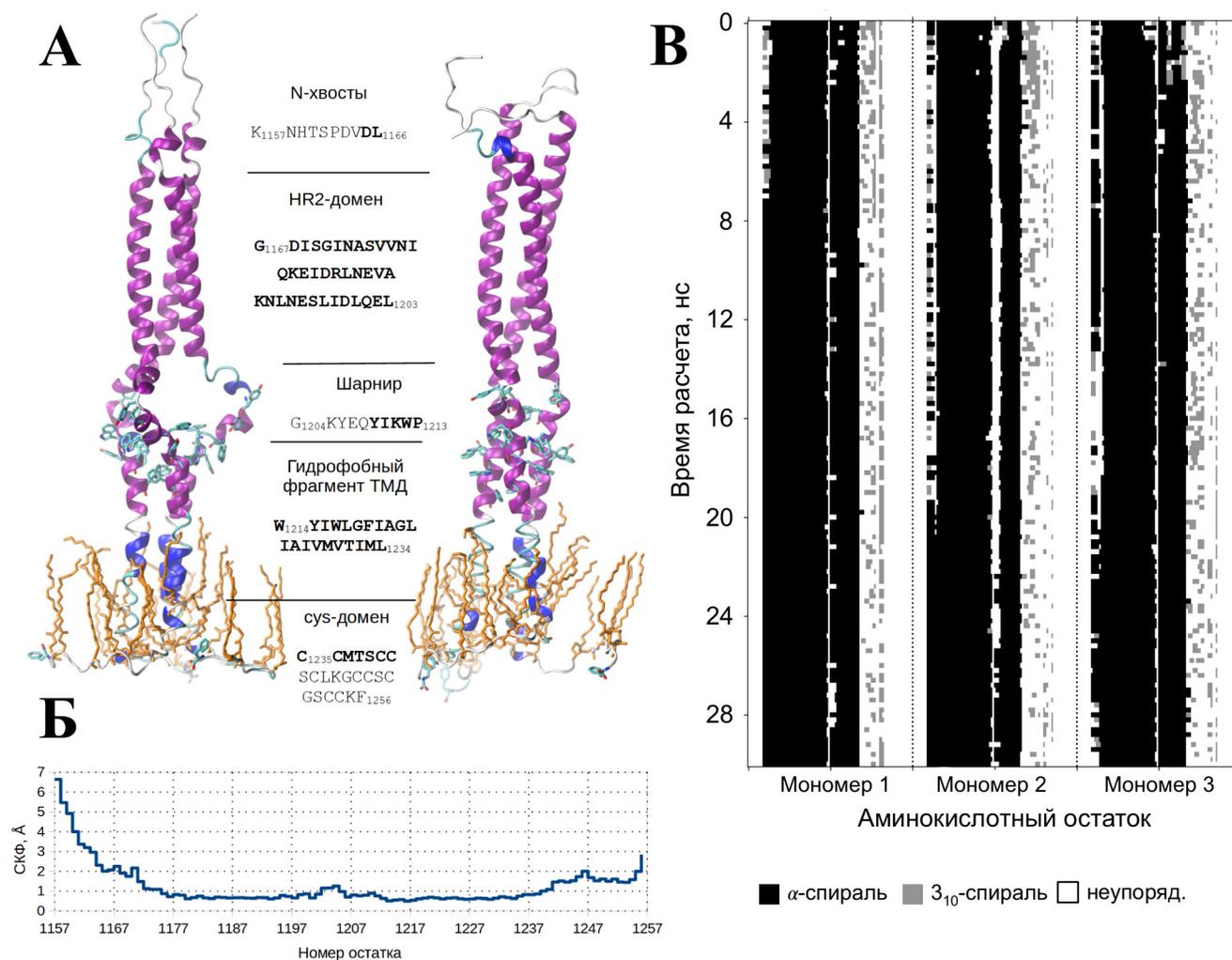


Рис. 1. А: Модель структуры фрагмента S-белка коронавируса SARS CoV-2 (домен HR2 и ТМД, остатки 1157–1256) до молекулярной динамики (слева) и после (справа). α -Спирали показаны фиолетовым, 3–10-спирали – синим, остатки пальмитоила – оранжевым. Ароматические остатки показаны в стержневом представлении. В последовательности полужирным выделены спиральные остатки. **Б:** Среднеквадратичная флуктуация (СКФ) C α -атомов остатков моделируемого фрагмента S-белка на заключительном этапе расчета МД (20–30 нс). **В:** Изменения вторичной структуры фрагмента S-белка в ходе МД в полноатомном представлении. По вертикальной оси – время расчета, по горизонтальной – аминокислотные остатки трех мономеров. Каждая точка диаграммы отображает вторичную структуру индивидуального остатка в конкретный момент расчета.

использование данного силового поля позволяет более точно воспроизводить конформацию экспериментально определенных структур, в т.ч. коротких мембранных белков, не представляющих собой идеальные α -спирали [20].

Выполненный расчет полноатомной МД показывает, что структура белка претерпевает ряд значительных изменений. Отметим в связи с этим, что до момента расшифровки полной структуры белка представленные на рис. 1, А границы являются в известном смысле условными. Так, например, веб-сервис ТМНММ [21] предсказывает, что остатки 1214–1234 (рис. 1, А) располагаются в гидрофобном слое мембраны. Однако предварительный расчет МД показал, что размещение объемных ароматических остатков (W1214YIWLGF1220) в этом слое мембраны оказывается стерически невыгодным и этот фрагмент «всплывает» в область полярных головок внешнего слоя липидов, одновременно вовлекая внутрь гидрофобного слоя мембраны часть остатков *cys*-домена из области полярных головок внутреннего слоя. В то же время известно, что неупорядоченная вторичная структура не характерна для остатков трансмембранных фрагментов белков, что позволяет предположить наличие спиральной структуры и у следующих за L1234 остатков. В пользу удлиненного спирального ТМД говорят и структуры мономера (PDB ID 6b3u, [16]) и тримеров (PDB ID 5jyn [15] и 6e8w [6]) ТМД оболочечного белка gp41 ВИЧ, имеющие длину спиралей более 30 остатков. Исходя из этого сопоставления, в нашей модели спиральный фрагмент простирается до остатка S1241, и общая длина каждой трансмембранной спирали составляет 34 остатка.

В ходе МД N-хвосты в целом сохранили свое неупорядоченное строение (рис. 1, А; справа) и продемонстрировали высокую подвижность (рис. 1, Б). Однако можно заметить частичное упорядочивание остатков N-хвостов с образованием α -спиралей (рис. 1, В), что согласуется со спиральной конформацией остатков на С-конце ряда структур эктодомена S-белка (PDB ID 6xg8 и др.). Напротив, суперспиральное состояние HR2-домена оказалось очень стабильным, а наибольшая подвижность наблюдается на его границах. Шарнирный фрагмент коренным образом меняет свою конформацию, однако тепловые флуктуации атомов относительно невелики. Трансмембранный домен в целом сохраняет свою спиральную структуру, включая конформационно напряженные 3–10-спирали, наблюдаемые в структуре шаблона (PDB ID 6e8w). Для трансмембранных спиралей, как правило, не характерны большие флуктуации и модель, предложенная в настоящей работе, не является исключением. Наконец, *cys*-домен, несмотря на пальмитоилирование и тесное взаимодействие с мембраной, продемонстрировал в среднем довольно высокую подвижность за счет,

главным образом, относительно подвижных замыкающих остатков K1256 и F1256. Здесь же отметим, что остатки пальмитоила, присоединенные к остаткам S1235 и S1236, демонстрируют поведение, отличающееся от поведения аналогичных остатков, присоединенных к другим остаткам цистеина. Указанные остатки цистеина в нашей модели принадлежат ТМД и заметно заглублены в мембрану. Это приводит к тому, что присоединенные к ним ацильные цепи по геометрическим соображениям оказываются способны проникать во внешний слой липидов мембраны, в то время как ацильные цепи остальных остатков пальмитоила не способны к этому и совершают флуктуации исключительно в пределах внутреннего слоя липидов. В этой связи интересно отметить, что ранее методами масс-спектрометрии было установлено [22], что остатки цистеина на С-конце ТМД гемагглютинина вируса гриппа А подвергаются, скорее, не собственно пальмитоилированию, а стеарилированию. Наши наблюдения показывают, что положение остатков цистеина на С-конце ТМД S-белка также допускает их стеарилирование, в то время как присоединение более длинной алифатической цепи приведет к локальному разупорядочиванию мембранного окружения. Таким образом, результаты МД показывают, что именно стеарилирование остатков цистеинов в ТМД S-белка является наиболее вероятным вариантом посттрансляционной модификации этих остатков в природных условиях.

Благодаря наличию слабоструктурированного (в начальный момент) шарнира, домен HR2 может совершать колебания относительно ТМД, однако их амплитуда невелика. Угол между доменами на протяжении траектории меняется незначительно, достигая 20° в первые 10 нс, снижаясь по мере структурирования шарнира на протяжении последующих 10 нс до 5° и сохраняясь на таком уровне в дальнейшем.

Интересно сопоставить наши результаты с ЯМР-анализом ТМД S-белка (остатки 1209–1237) [23], который имеет аминокислотную последовательность, отличающуюся от канонической (Uniprot ID P0DTC2): в позициях 1229 и 1233 последовательность имеет остатки Leu вместо Met, а в позициях 1235–1237 –последовательность Ser-Ser-Thr вместо Cys-Cys-Met. Авторам не удалось определить строение N-конца ТМД (остатки 1209–1217), обогащенного ароматическими остатками, в то время как остатки 1218–1237 образуют тример из практически параллельных α -спиралей, однако межспиральные контакты совершенно отличаются от ранее изученных тримеров (PDB ID 5jyn, 6e8w и др.) [23]. Авторы обнаружили, что сердцевина тримера образована четырьмя неполярными остатками сходного размера I1221, I1225, L1229 и L1233, обеспечивающими стабильность всего тримера в целом. Однако такое

взаиморасположение спиралей вызывает вопросы при переходе к канонической последовательности, в которой два из этих четырех остатков являются остатками метионина и которая замыкается трипептидом Cys-Cys-Met. Во-первых, более крупные остатки метионина будут нарушать плотную упаковку сердцевины тримера, выявленную с помощью ЯМР. Во-вторых, из геометрических соображений следует, что по крайней мере один из этой пары остатков цистеина (а также один из следующей пары C1240-C1241) будет также ориентирован в сердцевину и его пальмитоилирование будет поэтому затруднено или невозможно. Таким образом, предложенная на основе анализа ЯМР модель ТМД плохо согласуется с нативной конформацией S-белка.

Отметим также вероятную роль пальмитоилирования в поддержании структурной стабильности ТМД S-белка. Как упоминалось выше, часть спиралей ТМД (рис. 1, А) представлена напряженными 3–10-спиралями, которые довольно редко встречаются в мембранных белках. Нами был выполнен предварительный расчет МД непальмитоилированного ТМД S-белка, в результате которого 3–10-спирали превратились в более стабильные α -спирали, что нарушило структуру тримера (данные не приведены). В случае МД пальмитоилированного ТМД превращения 3–10-спиралей в α -спирали не происходит (рис. 1, А, В). Таким образом, можно констатировать, что пальмитоилирование ограничивает конформационную подвижность спиралей в ТМД и стабилизирует структуру этого домена. Косвенным подтверждением такой роли пальмитоилирования являются экспериментальные данные о большей важности пальмитоилирования остатков цистеина, расположенных в начале cys-домена [24]. Согласно нашей модели, эти остатки принадлежат ТМД и их пальмитоилирование препятствует конформационному переходу 3–10-спиралей в α -спирали.

Крупнозернистая молекулярная динамика. Для выяснения влияния пальмитоилирования остатков цистеина на локальное липидное окружение ТМД были проведены дополнительные исследования пальмитоилированного и непальмитоилированного белка в крупнозернистом приближении, встроенного в мембрану аналогичного состава, что позволило увеличить время моделирования до 1 мкс.

Для обеих систем была рассчитана локальная толщина бислоя мембраны (рис. 2, А). Видно, что наличие остатков пальмитоила приводит к локальному утолщению и искривлению мембраны вокруг белка (черная область вокруг белой, соответствующей белку; рис. 2, А). Усредненная локальная площадь, приходящаяся на липид, со встроенным пальмитоилированным (слева) и непальмитоилированным (справа) тримером показана

на рис. 2, Б. Липиды вокруг белка упакованы плотнее, чем в остальной области мембраны. Кроме того, были дополнительно рассчитаны радиальные функции распределения представленных в мембране липидов относительно центра масс ТМД в плоскости мембраны в двух системах (рис. 2, Д–З). Из результатов следует, что пальмитоилирование белка практически не влияет на распределение в мембране холестерина (рис. 2, Д) и ряда других липидов (ДПФС, ДПФХ, ДПФЭ, ПСМ, графики не показаны), в то время как значения радиальной функции распределения для ПОФЭ и ПОФС (рис. 2, Е–З) вблизи непальмитоилированного белка оказываются выше, чем вблизи пальмитоилированного, т.е. мембрана в области ТМД становится обогащенной ПОФЭ и ПОФС. Для ПОФХ наблюдается обратный эффект – вероятность обнаружить этот липид вблизи пальмитоилированного белка существенно выше по сравнению с непальмитоилированным. Таким образом, пальмитоилирование приводит к значительному перераспределению типов липидов в реалистичной многокомпонентной модели бислоя. В совокупности с наблюдающимся утолщением мембраны и уменьшением площади, приходящейся на липид, вблизи пальмитоилированного белка это может свидетельствовать о формировании в его окрестности липидного микродомена, напоминающего рафт. Эти наблюдения также хорошо согласуются эффектами пальмитоилирования, представленными в работе Шароле и ван-дер-Гут [25]: пальмитоилы могут увеличивать эффективную гидрофобную длину ТМД белка, увеличивая толщину прилегающего бислоя липидов и способствуя ассоциации с упорядоченными липидами.

В процессе МД HR2-домен тримера S-белка наклоняется относительно ТМД (рис. 2, Б–Г) аналогично тому, как это происходило в полномасштабном моделировании, что хорошо соотносится с максимумом распределения углов в районе 20° и значительной долей конформаций с углом между доменами вплоть до 0° (т.е. полностью «выпрямленной» конформации). Кроме того, наличие остатков пальмитоила незначительно уменьшает амплитуду изгиба S-белка. Отчасти это может быть связано с тем, что вокруг ТМД белка сформировался более плотный и толстый слой мембраны, приводящий к снижению его подвижности.

Рассчитанные коэффициенты латеральной диффузии пальмитоилированного и непальмитоилированного белка, $D_{\text{пальмитоил.}} = 0,0205 \pm 0,0004 \cdot 10^{-5}$ и $D_{\text{непальмитоил.}} = 0,0025 \pm 0,0001 \cdot 10^{-5}$ см²/с, свидетельствуют о том, что пальмитоилирование на порядок замедляет движение белка в латеральной плоскости мембраны. Можно предположить, что подобное замедление способствует стабилизации тримера ТМД S-белка.

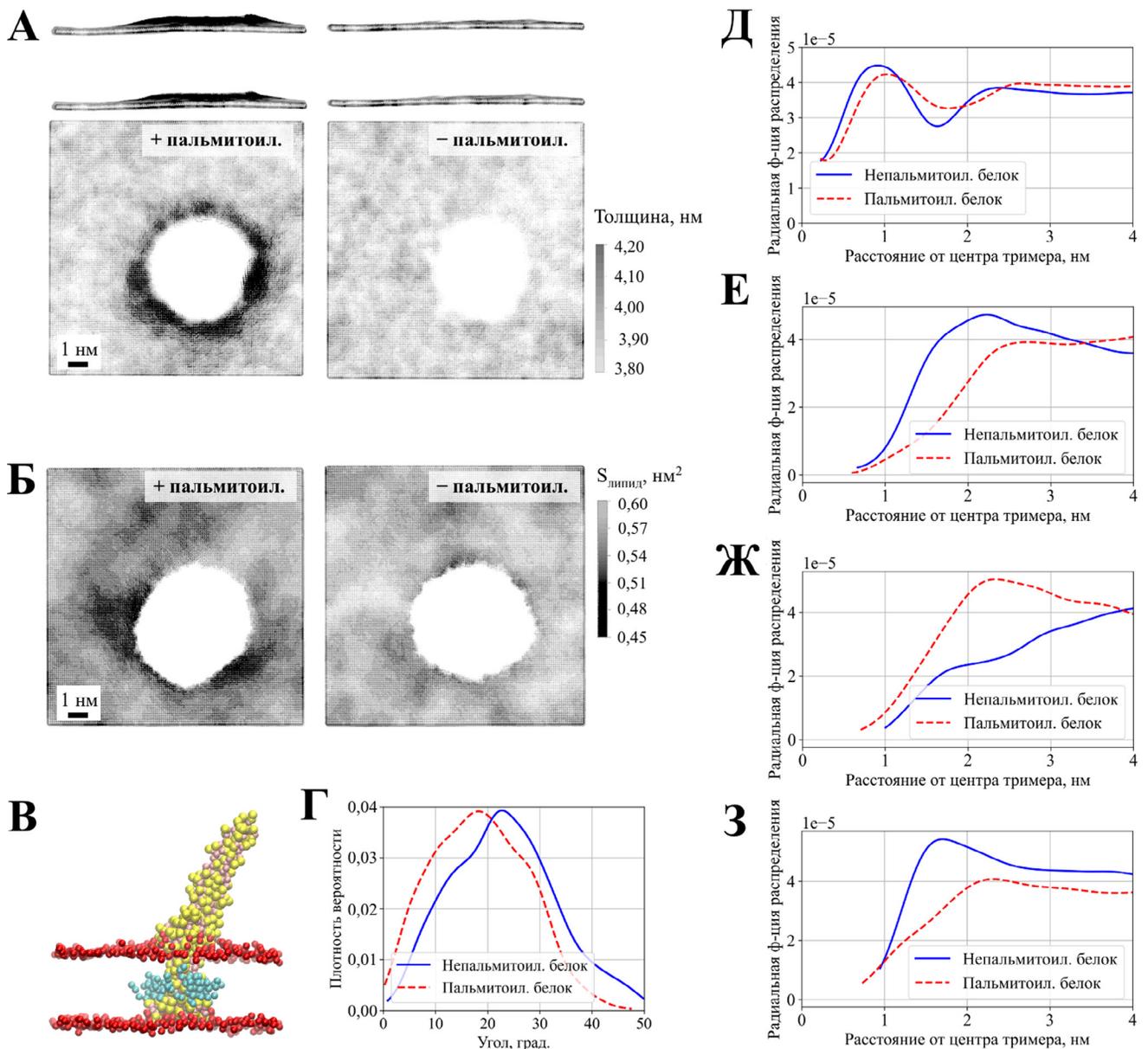


Рис. 2. Крупнозернистое моделирование тримера в модельной липидной мембране. **А:** локальная толщина бислоя со встроенным пальмитоилированным (слева) и непальмитоилированным (справа) тримером. Показан вид бислоя сбоку и сверху. **Б:** усредненная локальная площадь, приходящаяся на липид, со встроенным пальмитоилированным (слева) и непальмитоилированным (справа) тримером. **В:** репрезентативный кадр из траектории МД пальмитоилированного тримера (частицы белка показаны серыми и желтыми сферами, остатки пальмитоила – циановыми) с наклоненным относительно ТМД внешним доменом. В мембране показаны только крупнозернистые частицы, соответствующие фосфатной группировке липидов (красные сферы); **Г:** распределение значений угла наклона HR2-домена по отношению к ТМД. **Д–З:** радиальные функции распределения холестерина, ПОФЭ, ПОФХ и ПОФС соответственно, рассчитанные относительно центра масс ТМД в плоскости мембраны.

Таким образом, в нашем исследовании была впервые построена трехмерная модель ТМД и HR2-домена S-белка, учитывающая пальмитоилирование цистеинов. Встроенная в мембрану сложного состава модель белка была оптимизирована, ее стабильность оценена методами МД в полноатомном и крупнозернистом приближениях. Было показано, что конформационная подвижность HR2-ТМД-фрагмента обеспечивается изгибом по шарнирной области на границе двух доменов. Нами также было показано, что пальмитоилирование ТМД приводит к локальным изменениям в бислое (его утолщению

и уплотнению, а также перераспределению ряда липидов), напоминающим формирование рафтоподобного микродомена. Полученную в работе модель можно использовать в дальнейших исследованиях при интерпретации структурных данных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-60258). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Letko M., Marzi A., Munster V.* Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses // *Nat. Microbiol.* 2020. Vol. 5. N 4. P. 562–569.
2. *Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D.* Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein // *Cell.* 2020. Vol. 181. N 2. P. 281–292.e6.
3. *Turoňová B., Sikora M., Schürmann C., et al.* *In situ* structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges // *Science.* 2020. Vol. 370. N 6513. P. 203–208.
4. *Webb B., Sali A.* Protein structure modeling with MODELLER // *Structural Genomics. Methods in Molecular Biology*, vol 2199 / Eds. Y.W. Chen and C.P.B. Yiu. N.Y.: Humana, P. 239–255.
5. *Hakansson-McReynolds S., Jiang S., Rong L., Caffrey M.* Solution structure of the severe acute respiratory syndrome-coronavirus heptad repeat 2 domain in the prefusion state // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. N 17. P. 11965–11971.
6. *Fu Q., Shaik M.M., Cai Y., Ghantous F., Piai A., Peng H., Rits-Volloch S., Liu Z., Harrison S.C., Seaman M.S., Chen B., Chou J.J.* Structure of the membrane proximal external region of HIV-1 envelope glycoprotein // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2018. Vol. 115. N 38. P. E8892–E8899.
7. *Jo S., Kim T., Iyer V.G., Im W.* CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM // *J. Comput. Chem.* 2008. Vol. 29. N 11. P. 1859–1865.
8. *Woo H., Park S.J., Choi Y.K., Park T., Tanveer M., Cao Y., Kern N.R., Lee J., Yeom M.S., Croll T.I., Seok C., Im W.* Developing a fully glycosylated full-length SARS-CoV-2 spike protein model in a viral membrane // *J. Phys. Chem. B.* 2020. Vol. 124. N 33. P. 7128–7137.
9. *Abraham M.J., Murtola T., Schultz R., Pall S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX.* 2015. Vol. 1–2. P. 19–25.
10. *Huang J., Rauscher S., Nawrocki G., Ran T., Feig M., de Groot B., Grubmüller H., MacKerell A.J.* CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins // *Nat. Methods.* 2017. Vol. 14. N 1. P. 71–73.
11. *de Jong D.H., Singh G., Bennett W.F.D., Arnarez C., Wassenaar T.A., Schäfer L.V., Periole X., Tieleman D.P., Marrink S.J.* Improved parameters for the Martini coarse-grained protein force field // *J. Chem. Theory Comput.* 2013. Vol. 9. N 1. P. 687–697.
12. *Atsmon-Raz Y., Tieleman D.P.* Parameterization of palmitoylated cysteine, farnesylated cysteine, geranylgeranylated cysteine, and myristoylated glycine for the Martini force field // *J. Phys. Chem. B.* 2017. Vol. 121. N 49. P. 11132–11143.
13. *de Jong D.H., Baoukina S., Ingolfsson H.I., Marrink S.J.* Martini straight: Boosting performance using a shorter cutoff and GPUs // *Comput. Phys. Commun.* 2016. Vol. 199. P. 1–7.
14. *Gapsys V., de Groot B.L., Briones R.* Computational analysis of local membrane properties // *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2013. Vol. 27. N 10. P. 845–858.
15. *Dev J., Park D., Fu Q., Chen J., Ha H.J., Ghantous F., Herrmann T., Chang W., Liu Z., Frey G., Seaman M.S., Chen B., Chou J.J.* Structural basis for membrane anchoring of HIV-1 envelope spike // *Science.* 2016. Vol. 353. N 6295. P. 172–175.
16. *Chiliveri S.C., Louis J.M., Ghirlando R., Baber J.L., Bax A.* Tilted, uninterrupted, monomeric HIV-1 gp41 transmembrane helix from residual dipolar couplings // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. Vol. 140. N 1. P. 34–37.
17. *Mahajan M., Bhattacharjya S.* Solution structure of pre transmembrane domain. *Worldwide Protein Data Bank*, 2014. DOI: 10.2210/pdb2RUN/pdb.
18. *Veit M.* Palmitoylation of virus proteins // *Biol. Cell.* 2012. Vol. 104. N 9. P. 493–515.
19. *Petit C.M., Chouljenko V.N., Iyer A., Colgrove R., Farzan M., Knipe D.M., Kousoulas K.G.* Palmitoylation of the cysteine-rich endodomain of the SARS-coronavirus spike glycoprotein is important for spike-mediated cell fusion // *Virology.* 2007. Vol. 360. N 2. P. 264–274.
20. *Best R.B., Zhu X., Shim J., Lopes P.E.M., Mittal J., Feig M., MacKerell A.D.* Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain $\chi(1)$ and $\chi(2)$ dihedral angles // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. Vol. 8. N 9. P. 3257–3273.
21. *Krogh A., Larsson B., von Heijine G., Sonnhammer E.L.L.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes // *J. Mol. Biol.* 2001. Vol. 305. N 3. P. 567–580.
22. *Serebryakova M.V., Kordyukova L.V., Baratova L.A., Markushin S.G.* Mass spectrometric sequencing and acylation character analysis of C-terminal anchoring segment from Influenza A hemagglutinin // *Eur. J. Mass Spectrom.* 2006. Vol. 12. N 1. P. 51–62.
23. *Fu Q., Chou J.J.* A trimeric hydrophobic zipper mediates the intramembrane assembly of SARS-CoV-2 spike // *bioRxiv.* 2021. DOI: 10.1021/jacs.1c02394.
24. *Thorp E.B., Boscarino J.A., Logan H.L., Goletz J.T., Gallagher T.M.* Palmitoylations on murine coronavirus spike proteins are essential for virion assembly and infectivity // *J. Virol.* 2006. Vol. 80. N 3. P. 1280–1289.
25. *Charollais J., Van Der Goot F.G.* Palmitoylation of membrane proteins (Review) // *Mol. Membr. Biol.* 2009. Vol. 26. N 1. P. 55–66.

Поступила в редакцию 25.05.2021 г.

После доработки 22.06.2021 г.

Принята в печать 24.06.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Molecular modeling of HR2 and transmembrane domains of the SARS-CoV-2 S-protein in the prefusion state

M.E. Bozdaganyan^{1,2} , P.S. Orekhov^{1,3} , D.S. Litvinov¹, V.N. Novoseletsky^{1,*} 

¹*Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

²*N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Kosygina 4, Moscow, 119991, Russia;*

³*Institute of Personalized Medicine, Sechenov University, Bolshaya Pirogovskaya 2–4, 119435 Moscow, Russia*
**e-mail: novoseletsky@mail.bio.msu.ru*

The SARS-CoV-2 virus causes the coronavirus infection COVID-19 and remains in the focus of the researchers around the world. The penetration of the SARS-CoV-2 virus into the cell begins with the binding of its S-protein to the angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) expressed on the cell surface. The study of the spatial structure of the S-protein is necessary for the understanding of the molecular aspects of its functioning. At present, the structure of almost the entire S-protein molecule has been well studied by experimental methods, with the exception of its endodomain, transmembrane domain, and adjacent ectodomain residues. We performed molecular modeling of the structure of the S-protein fragment corresponding to its supercoiled HR2 domain and fully palmitoylated transmembrane domain. The stability of the model in the lipid bilayer is confirmed by means of molecular dynamics simulations in full-atomic and coarse-grained representation. It was shown that palmitoylation leads to a significant decrease in the mobility of the transmembrane domain and local thickening of the bilayer, which may be important for the process of protein trimerization.

Keywords: *molecular modeling, SARS-CoV-2, S-protein, lipid bilayer, palmitoylation, trimeric coiled coil*

Funding: The research was funded by the Russian Foundation for Basic Research, project number 20-04-60258.

Сведения об авторах

Боздаганян Маринэ Евгеньевна – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: bozdaganyan@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1647-1627>

Орехов Филипп Сергеевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: orekhov@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4078-4762>

Литвинов Даниил Сергеевич – студент биологического факультета МГУ (магистерская программа «Структурная биология»). Тел.: 8-495-939-57-38; daniillitvinov997@gmail.com

Новоселецкий Валерий Николаевич – канд. физ.-мат. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: novoseletsky@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4090-4859>