

A Sars-CoV-2 (COVID-19) koronavírusal szembeni antagonisták számítógépes szűrése molekuláris dokkolással

Ran Yu, Liang Chen, Rong Lan, Rong Shen, Peng Li

K I V O N A T

Az új koronavírus (SARS-CoV-2) jelenlegi terjedése mellett nagy fontossága van egy vírusellenes gyógyszer felfedezésének. A potenciális gyógyszerek szűrése az AutoDock Vina-t használták az új koronavírus strukturális fehérje és nem-strukturális fehérje helyeinek molekuláris dokkolásával. A ribavirint, ami egy általános vírusellenes gyógyszer, a remdesivirt, a klorokvint és a luteolint vizsgálták. A loncról általában úgy vélik a hagyományos kínai orvoslásban, hogy vírusellenes hatásai vannak. Ebben a kutatásban a luteolinról (amely a lonc fő flavonoidja), hogy magas affinitással kötődik a SARS-CoV-2 fő proteázának ugyanazon helyeihez, mint a kontroll molekula. A klorokvinról bebizonyosodott, hogy klinikailag hatásos és képes a fő proteázhoz kötődni; ez lehet ennek a gyógyszernek a vírusellenes mechanizmusa. Ez a kutatás a molekuláris dokkolásra korlátozódott, és nem lett validálva molekuláris dinamikai szimulációkkal. A kölcsönhatások a fő proteázzal kulcsszerepet játszhatnak a vírusok elleni küzdelemben. A luteolin egy figyelemre méltó potenciális vírusellenes molekula.

1. Bevezetés

Az új koronavírus, a 2019-nCoV, amely súlyos akut légzőszervi szindróma koronavírus 2-ként (SARS-CoV-2) ismert, nemrégiben bukkant fel Hupei tartományban, a Kínai Népköztársaságban. A 2019-nCoV teljes genom szekvenciáját először 2020. január 10.-én adták ki. A 2019-nCoV széles körben fertőz emlősöknél, beleértve az embereket is. Az fertőzés átadásának ez a jellemzője a fertőzés állatról emberre történő átadásának lehetőségéhez vezet. A 2019-nCoV erősen fertőző, és az enyhétől a súlyosig terjedő légúti fertőzést okozhat. A 2019-nCoV terjedése nagy figyelmet és aggodalmat keltett világszerte. 2003 óta az emberek körében két koronavírushoz kapcsolódó válság alakult ki. A súlyos akut légzőszervi szindróma koronavírus (SARS-CoV) 2003-ban tört ki, a közel-keleti légzőszervi szindróma koronavírus (MERS-CoV) az Arab Félszigeten bukkant fel 2012-ben, 35 %-os halálozási aránnyal.

A koronavírusok (CoV-ok) kódolják a poliproteinek (pp) formájában kifejeződő replikáz komplexet (ORF1ab), amelyek a nem-strukturális fehérjéket (nsp/non-structural protein) és négy strukturális fehérjét, a tüske (S/spike), a boríték (E/envelope), a membrán (M/membrane) és a nukleokapszid (N/nucleocapsid) fehérjéket szintetizálják a proteolitikus feldolgozás során. A fő proteáz, a 3CL proteáz (3CLpro) kulcsfontosságú enzim a pp1a és a pp1ab poliproteinek feldolgozásában. Az ORF1a-t és az ORF1ab-t a papain-szerű proteáz (PLpro, nsp3) és a 3C-szerű proteáz (3CLpro, nsp5) hasítja, hogy nsp-t hozzon létre. A SARS-CoV 3CLpro-nak fontos funkciója van és a vírusellenes gyógyszerek aktív

célpontjának tekintik. Az elmúlt évtizedben számos 3CLpro gátlóról jelentek meg közlések, és számos gátlót találtak szűrési és struktúra alapú tervezéssel. A PLpro egy nélkülözhetetlen enzim a vírus replikációjához és a gazdasejt megfertőzéséhez, és fontos célpontja a koronavírus gátlóknak.

Egy újabb tanulmány azt mutatta, hogy a 2019-nCoV az angiotenzin átalakító enzim 2-t (ACE2) használja receptorként a gazdasejtekbe történő bejutáshoz. Az S fehérje, ami egy 1-es típusú glikoprotein a vírus felületén, kulcsszerepet játszik a vírus gazdasejtekbe történő bejutásában. Az S fehérje segíteni tudja a vírusnak a gazdasejt akceptorához történő kötődését, ami nagy figyelmet keltett a receptor kötésben betöltött funkciója miatt. Az S fehérje receptor kötő doménje (RBD/receptor binding domain) a gazdasejthez kötődik. A SARS-CoV-ból származó RBD-kben lévő aminosav szekvenciák összesen 72 %-ban azonosak. A 2019-nCoV-ban azonban a merev (szerkezetű) prolin maradékokat egy külön hurok helyettesíti rugalmas (szerkezetű) glicil maradékokkal. A hurokban levő egyedülálló fenilalanin (F486) képes behatolni az ACE2 hidrofób zsebébe és kulcsfontosságú szerepet játszhat az akceptor felismerésében. Az Nsp12 egy virális RNS-függő RNS polimeráz (RdRp) nsp7 és nsp8 kofaktorokkal és magas a polimeráz aktivitása. A 2019-nCoV-ban lehetséges gyógyszer-célpontként négy funkcionális fehérjét, a 3CLpro-t (a fő proteáz), az RdRp-t, a PLpro-t és az S-t vizsgálták. Nincs engedélyezett gyógyszer a COVID-19 kezelésére. A leggyorsabb módja a 2019-nCoV ellenes gyógyszereket megtalálásának a gyógyításban általánosan használt gyógyszerek szűrése.

A klorokvin egy maláriaellenes gyógyszer, amelyet a Bayer fejlesztett ki Németországban 1934-ben a természetes maláriaellenes gyógyszerek helyettesítésére. Erről a gyógyszerről megállapították, hogy hatásos a SARS-CoV-2-vel fertőzött betegek kezelésére. A klorokvin gátolta a kinon redukáz 2-t, amely strukturálisan hasonló az UDP-N-acetilglükózamin 2 epimerázhoz, ami olyan enzim, amely részt vesz a sztiálsavak bioszintézisében. A sztiálsav-bioszintézis klorokvin általi lehetséges megzavarása magyarázhatja ennek a gyógyszernek a széles vírusellenes spektrumát. A klorokvin azzal is tudja gátolni a korai stádiumú vírusreplikációt, hogy megzavarja a burkolt vírusok pH-függő, endoszóma által mediált virális bejutását, valamint a virális fehérjék poszt-transzlációs modifikációit. Azonban a klorokvin 2019-nCoV-val szembeni vírusellenes hatásmechanizmusa nem egyértelmű.

A ribavirin egy hagyományos vírusellenes gyógyszer, amelyet széles körben alkalmaznak a klinikákon számos vírusfertőzés kezelésére, de nincs szignifikáns hatása a SARS-CoV-2-re. Ezzel ellentétben az új vírusellenes gyógyszert, a remdesivirt hatásosnak találták a vírus replikációjának megelőzésére és lehetséges terápiás opció a COVID-19-re.

A lianhuaqingwen (LH) hagyományos kínai gyógyszer (TCM/traditional chinese medicine) készítmény, amelyről kimutatták, hogy széles spektrumú vírusellenes hatásokkal bír egy sor vírussal szemben. Az LH 2019nCoV-ellenes hatást is mutatott. A lonc és az aranyceserje [forsythia] általánosan használt vírusellenes összetevő a TCM-ben és az LH is tartalmazza. A TCM formulában az aktív összetevők típusa és mennyisége alapvető

fontosságú a készítmény működésének szempontjából. Az aranycserjét régóta használják lázcsillapító, gyulladásgátló és fertőzésgátló gyógyszerként Kelet-Ázsiában. Az aranycserjében található vegyületek vírusellenes hatást mutattak a H1N1 vírussal és a légzőszervi syncytialis vírussal (RSV) szemben. A lonc fő összetevői antibakteriális és vírusellenes hatásokat mutatnak. A loncban a fő flavonoid a luteolin. A TCM a légzőszervi fertőzések hatásos alternatív kezelése lehet. 2003-ban a TCM-et széles körben használták a súlyos akut légzőszervi szindróma (SARS) kezelésére. A 2019-nCoV és a SARS genomikus és a strukturális jellemzőinek nagy hasonlósága azt jelzi, hogy a TCM potenciálisan hasznos lehet a jelenlegi járványkitörés során. Ebben a kutatásban a klorokvin, a remdesivir, a ribavirin és a luteolin kötődését a 2019-nCoV fő fehérjeihez (3CLpro, PLpro, RdRp és S) számítógépes módszerekkel vizsgáltuk.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Szekvencia összerendezés és modellezés

Az újonnan felbukkant SARS-CoV-2 nukleotid gént (NC_045512.2) a National Center for Biotechnology Information-tól (Nemzeti Biológiai Információs Központ/NCBI) nukleotid adatbázisából szereztük be. Az olyan fontos vírusellenes gyógyszer célfehérjék, mint amilyen a 3CLpro, PLpro és az RdRp erősen megőrződnek a SARS-CoV-2-ben és a 2019-nCoV-ban, különösen a funkcionális helyek tekintetében.

A COVID-19 fő proteázának modelljét a Protein Data Bank-ból (Fehérje Adatbank/PDB) (www.rcsb.org) töltöttük le. A COVID-19 fő proteáza és egy N3 gátló által alkotott komplex kristálystruktúráját (PDB ID: 6LU7, A lánc) választottuk ki a 3CLpro modelljeként és az N3-at eltávolítottuk. Az N3 ligandot (N-[(5-metilizoxazol-3-yl)karbonil]alanil-1-valil-n-1—((1R,2Z)-4-(benziloxi)-4-oxo-1-[(3R)-2-oxopirrolidin-3-yl]metil]but-2-enil)-1-leucinamid) használtuk kontrollként. Az újabb kutatások azt mutatták, hogy a SARS-CoV-2 gének és a SARS-CoV gének nukleotidjai <80 %-ban azonosak és 89,10 %-ban hasonlóak. A humán koronavírus papain-szerű proteázok PLpro-jának röntgenszerkezetét használtuk a 2019-nCoV PLpro (PDB ID: 40VZ, A lánc) modelljeként. A P85 ligandot használtuk (N-[4-fluorfenil]metil]-1-[(1R)-1-naftalén-1-iletil]piperidin-4-karboxamid) kontrollként. A SARS-HCoV kibontott, feltárt szerkezetét (PDB ID: 6NUS, A lánc) használtuk a kötéshez, mert ez volt a SARS-CoV-2 RdRp-hez szekvenciálisan leginkább hasonló feltárt struktúra (97,08 %-os szekvencia azonosság). A 6NUS egy SARS-HCoV nem-strukturális fehérje 12 (nsp12) kibontott, feltárt struktúra (krio-elektronmikroszkópia) 3,5 Å felbontással, ami a fehérje adatbankban 2019-ben került elhelyezésre. A remdesivirt, a 2019-nCoV RdRp egy antagonistáját választottuk ki kontrollként. A 2019-nCoV S glikoprotein modellt (PDB ID: 6VSB, A, B, C lánc) használtuk modellként a molekuláris dokkoláshoz. A 6VSB egy kibontott, feltárt S fehérje prefúzió, egyetlen receptor kötő domén volt (krio-elektronmikroszkópia) 3,46 Å felbontással. A 6VSB Nag ligandját (N-acetil-D-glükózamin) használtuk kontrollként.

2.2. Molekuláris dokkolás

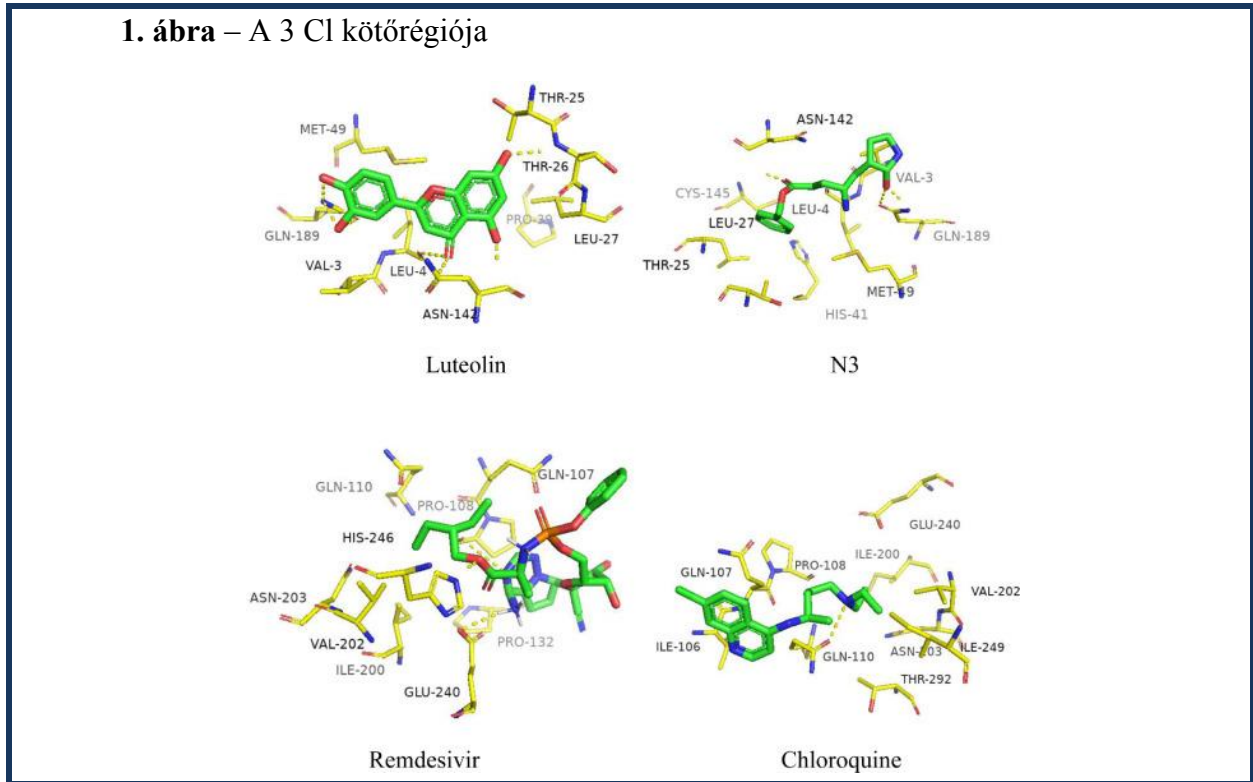
A dokkolási célként optimalizált modellel az AutoDock Vina szoftvert használtunk az összes dokkolási kísérletben. A szűrési módszer a molekuláris dokkolásra korlátozódott és a molekuláris dinamikai szimulációt nem végeztük el. A remdesivir és a ribavirin RdRp antagonisták. A remdesivir hatásos lehet az új koronavírus ellen: azonban a ribavirin hatástalan. A molekuláris dokkolást használtuk a két molekula közötti különbség tanulmányozására. A klorokvinról bebizonyosodott, hogy klinikailag hatásos és folytatni kell molekuláris célpontjának vizsgálatát. Az új koronavírus kezelésében a TCM kontextusában a luteolint, a lonc fő flavonoidját (a fő vírusellenes összetevő az LH-ban) választottuk ki a molekuláris dokkolásra, hogy tovább vizsgáljuk a gyógyszert. A SARS-CoV-2 célfehérjével szembeni ligandok tesztelését megelőzően a kis molekulák struktúráit a klasszikus MM2 (MM= molekulamechanikai) erőteret használva optimalizáltuk; a célok aktív hely aszpartátjait merevként (merev szerkezetüként) kezeltük. A potenciális vírusellenes gyógyszereket a molekulák és a receptor célok közötti hatásos kapcsolatok mutatják. A rácsdobozban (60 Å x 60 Å x 60 Å) a középpont a3CLpro-ra (-28,059, 9,486, 61,528) Å-nál; a rácsdobozban (60 Å x 60 Å x 60 Å) a középpont a PLpro-ra (-13,953, 51,391, -31,750) Å-nál; a rácsdobozban (126 Å x 126 Å x 126 Å) a középpont az S fehérjére (251,541, 330,170, 152,338) Å-nál; és a rácsdobozban (126 Å x 126 Å x 126 Å) a középpont a RdRp-re (152,179, 167,664, 166,985) Å-nál volt, ezeket használtunk a dokkolási kísérletekben az AutoDock eszközöket alkalmazva.

3. Eredmények és tárgyalás

3.1. 3CL proteáz

Az N3 molekula a 3CLpro kristálystruktúrájából izolált ligand molekula, amit kötőhely kontrollként használtunk. A dokkolási eredmények (1. ábra) elemzése szerint a luteolin és a kötőhelyek közötti kölcsönhatások erősen konzisztensek az N3-éval. A luteolin öt hidrogénkötést képezett a GLN-189-cel, a LEU4-gyel, a LEU-4-gyel, az ASN-142-vel, illetve a THR-26-tal. A MET-49 és a VAL-3 a luteolinnal lépett hidrofób kölcsönhatásba. Az N3-at tekintve 3-H kötések jöttek létre a CYS-145-tel és a GLN189-cel. Az N3 π -kation kapcsolatot hozott létre a HIS-41-gyel, és hidrofób reakciókat a THR-25-tel, a LEU-27-tel, a LEU-4-gyel, a VAL-3-mal és az ASN-142-vel. Hidrogénkötés kölcsönhatás van a klorokvin és a GLN-110 között a kötési helyen, hidrofób reakciók az ILE 249-cel, az ILE-200-zal, és π -kation kapcsolat a GLN-107-tel. A remdesivir 3-H kötésekét képezett a GLU-240-nel, a HIS-246-tal és a PRO-108-cal, hidrofób reakciókat a PRO-132-vel és az ILE-200-zal és π -kation kapcsolatot a GLN-107-tel.

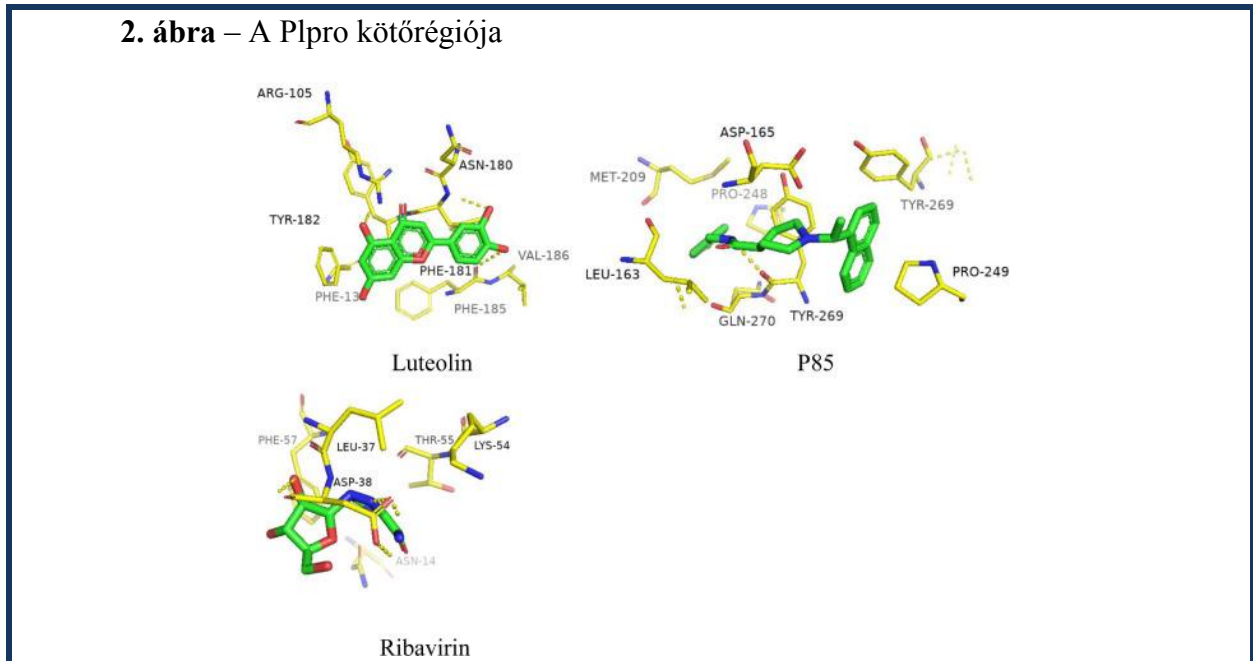
1. ábra – A 3 Cl kötőrégiója



3.2. PLpro

A PLpro P85-ös ligandját használtuk kontrollként. A 2. ábra a P85 által a TYR-269-cel létrehozott hidrogénkötéseket ábrázolja. A luteolin hidrogénkötéseket alkotott az ASN-180-cal, az ARG-105-tel és a PHE-185-tel a helyeken. A ribavirin és az ASP közötti kölcsönhatások hidrogénkötések voltak. A luteolin és a ribavirin kötőhelyei nem konzisztensek a kontroll molekuláéval.

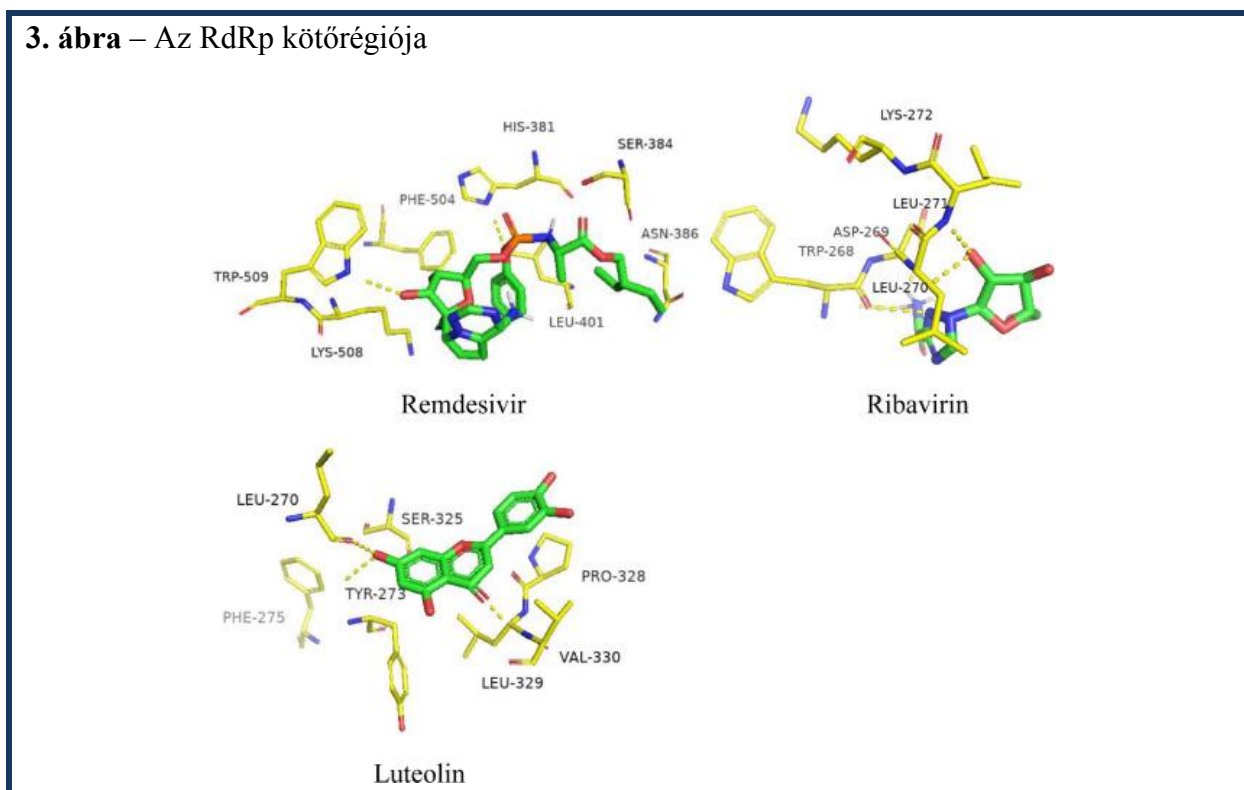
2. ábra – A Plpro kötőrégiója



3.3. RdRp

A 3. ábra mutatja a remdesivir által létrehozott 2-H kötések a TRP-509-cel és a HIS-381-gyel, a π -kation kapcsolatokat a PHE-504-gyel és a hidrofób reakciókat a LYS-508-cal, a LEU-401-gyel, az ASN-386-tal és a SER-384-gyel. A ribavirin 5-H kötések képezett a LEU-271-gyel, a LEU-270-tel, az ASP-269-cel és a TRP-268-cal. A luteolin 3-H kötések hozott létre a TYR-273-mal, a LEU-270-nel és a VAL-330-cal, két π -kation reakciót a SER-325-tel és a PHE-275-tel és két hidrofób reakciót a LEU-329-cel és a PRO-328-cal. A luteolin és a ribavirin kötőhelyei nem konzisztensek a remdesivirével; azonban a ribavirin és a luteolin kötőhelyei közeliek, amelyik egy másik aktív helyet jelez.

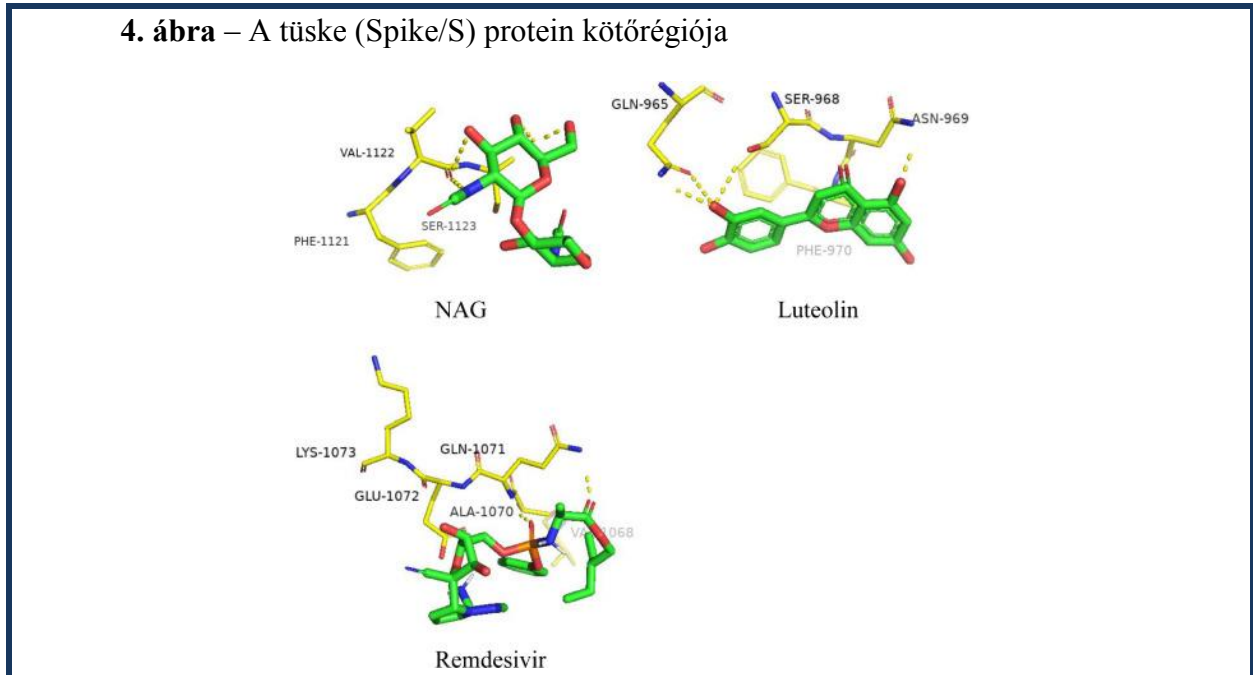
3. ábra – Az RdRp kötőrégiója



3.4. Tüske fehérje

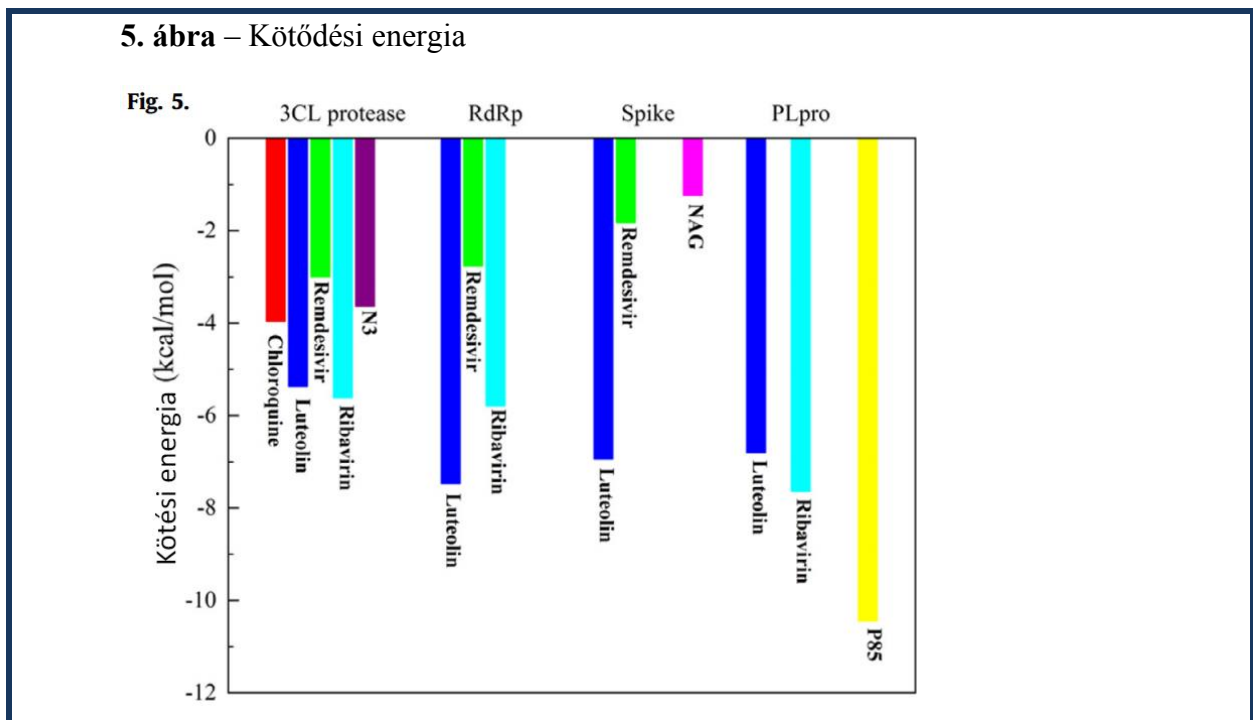
A 4. ábra a NAG ligandok, a luteolin és a remdesivir között a 2019-nCoV S fehérjéjével szemben a dokkolást követően kialakult interakciókat mutatja. A NAG-ról megállapították, hogy 3-H kötések képez a VAL-1122 és a SER-1123 maradékokkal. A NAG továbbá π -kation kapcsolatokat hozott létre a PHE-1121-tel. A luteolinnál 4H-kötések alakultak ki a GLN-965, a SER-968 és az ASN-969 maradékokkal. π -kation kölcsönhatás alakult ki a luteolin és a PHE-970 között. A remdesivir 2-H kötések hozott létre az ALA-1070-nel és a GLN-1071-gyel, és hidrofób kölcsönhatást a GLU-1072-vel, ahogyan az a 4. ábrán látható. A remdesivir kötési helye közel van a NAG kontroll molekulához.

4. ábra – A túske (Spike/S) protein kötőrégiója



A luteolin kötődési energiája a fő proteázhoz $-5,37$ kcal/mol volt és az N3-é $-3,63$ kcal/mol (5. ábra). A luteolin kötődési energiája az aktív helyhez még kisebb volt, mint a kontroll molekuláé, ami azt jelzi, hogy a luteolinnak nagyobb a kötődési aktivitása. Ami az RdRp-t és az S fehérjét illeti, a luteolinnak szintén kisebb a kötődési energiája. A kötődési energia szempontjából a luteolin erősebb kölcsönhatásokat mutat az új koronavírus célpontjaival.

5. ábra – Kötődési energia



4. Következtetés

Az LH hatásos lehet az új koronavírus ellen. A lonc és az aranycserje a fő vírusellenes gyógyszerek a formulában. A luteolin (a lonc fő flavonoidja) képes szorosán kötődni az új koronavírus fő proteázához. A luteolin a 2019-nCoV fő proteázának aktív helyeihez a kristályszerkezet ligandjáénál alacsonyabb kötődési energiával kötődik, ami egy lehetséges erős vírusellenes hatásra utal. Ez a kutatás azt jelzi, hogy a TCM lehetőségekkel bír az új koronavírus kezelésében. A klorokvin potenciálisan hatékony kezelésnek mutatkozott az új koronavírusal szemben; a fő proteázzal való kötődése egy kiegészítés lehet a hatásmechanizmusához. A luteolin hasznos lehet olyan új vegyületek kiválasztásában, amelyek specifikusan a SARS-CoV-2 fő proteáz helyeihez kötődnek.