



MODELLING OF NEF INTERACTION WITH CALNEXIN AND ABCA1 REVEALED POTENTIAL INHIBITOR COMPOUNDS

A.A. Anashkina, A.P. Tolstova, Ya.V. Tkachev, A.A. Adzhubei
Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Vavilova, 32, Moscow, Russia
anastasya.anashkina@gmail.com

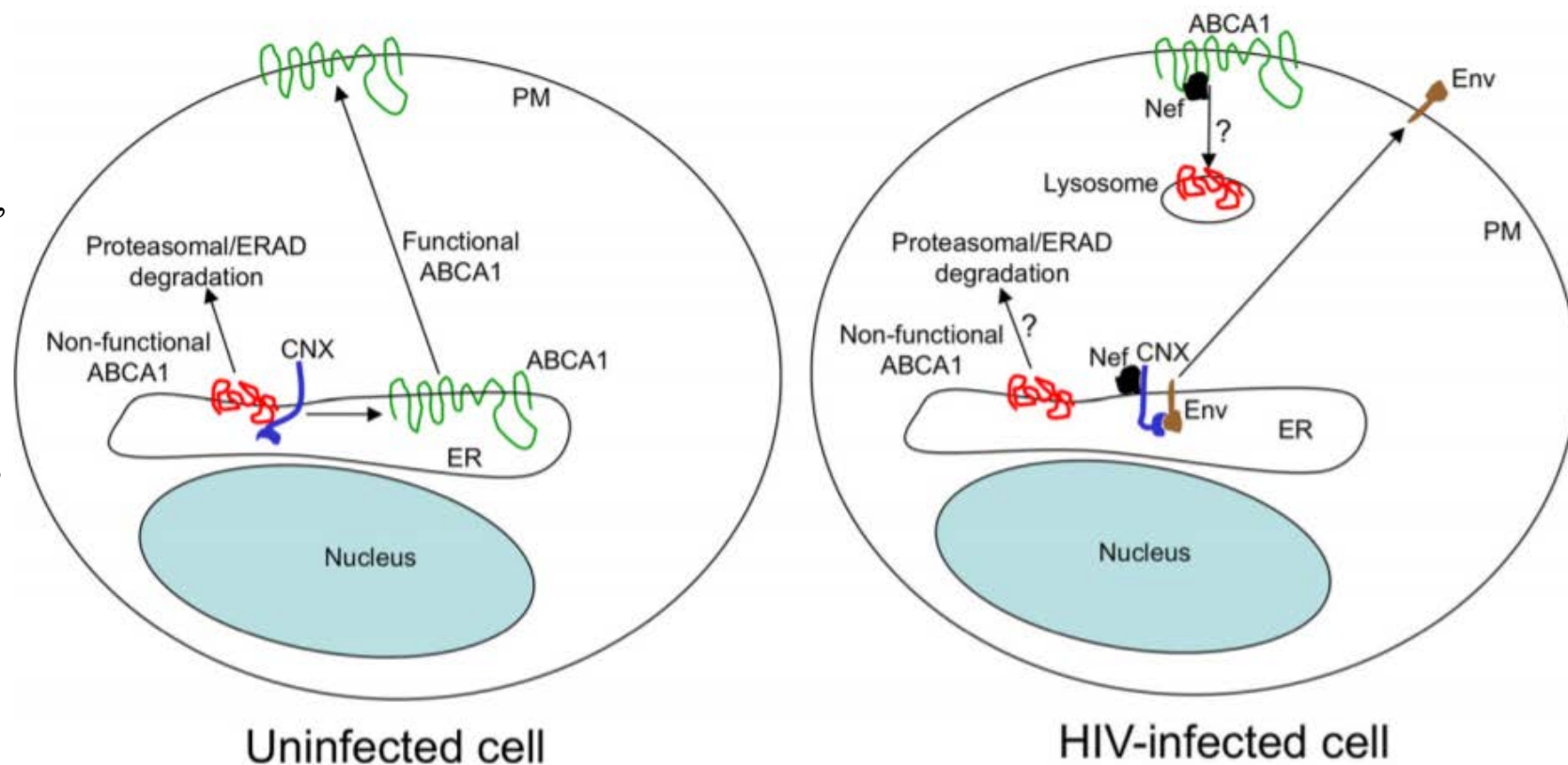
Нейрокогнитивные расстройства при ВИЧ

Среди пациентов с ВИЧ распространены умеренные формы нейрокогнитивных нарушений, которые существенно влияют на качество их жизни. В аутопсийном материале мозга пациентов с нейрокогнитивными нарушениями, проходивших кАРТ, не выявляются классические черты СПИДа-Д, такие как энцефалит и нейродегенерация. Основными патофизиологическими характеристиками ВИЧ-ассоциированного нейрокогнитивного расстройства в эпоху кАРТ являются демиелинизация нейронов и функциональные расстройства. Миелиновые оболочки вокруг аксонов необходимы для нормального функционирования мозга, поскольку они защищают аксоны и увеличивают скорость нейротрансмиссии. Демиелинизация, индуцируемая воспалительными процессами или нарушением метаболизма, приводит к проявлению ряда симптомов, в том числе к когнитивной дисфункции, двигательной недостаточности, болевому синдрому и развитию рассеянного склероза. Миелиновые оболочки, сформированные из модифицированных мембран олигодендроцитов, обогащены холестерином. Генетические или метаболические нарушения обмена холестерина часто приводят к дефектам миелинизации, как это показано для болезни Танжера, вызываемой мутациями в гене **ABCA1**, ассоциированном с неврологическими симптомами, обусловленными демиелинизацией и гипомиелинизацией.

Гипотеза: основным механизмом развития ВИЧ-ассоциированных нейрокогнитивных расстройств является нарушение миелинизации нейронов вследствие ухудшения метаболизма холестерина в астроцитах и олигодендроцитах, которое индуцируется белком ВИЧ-1 Nef.

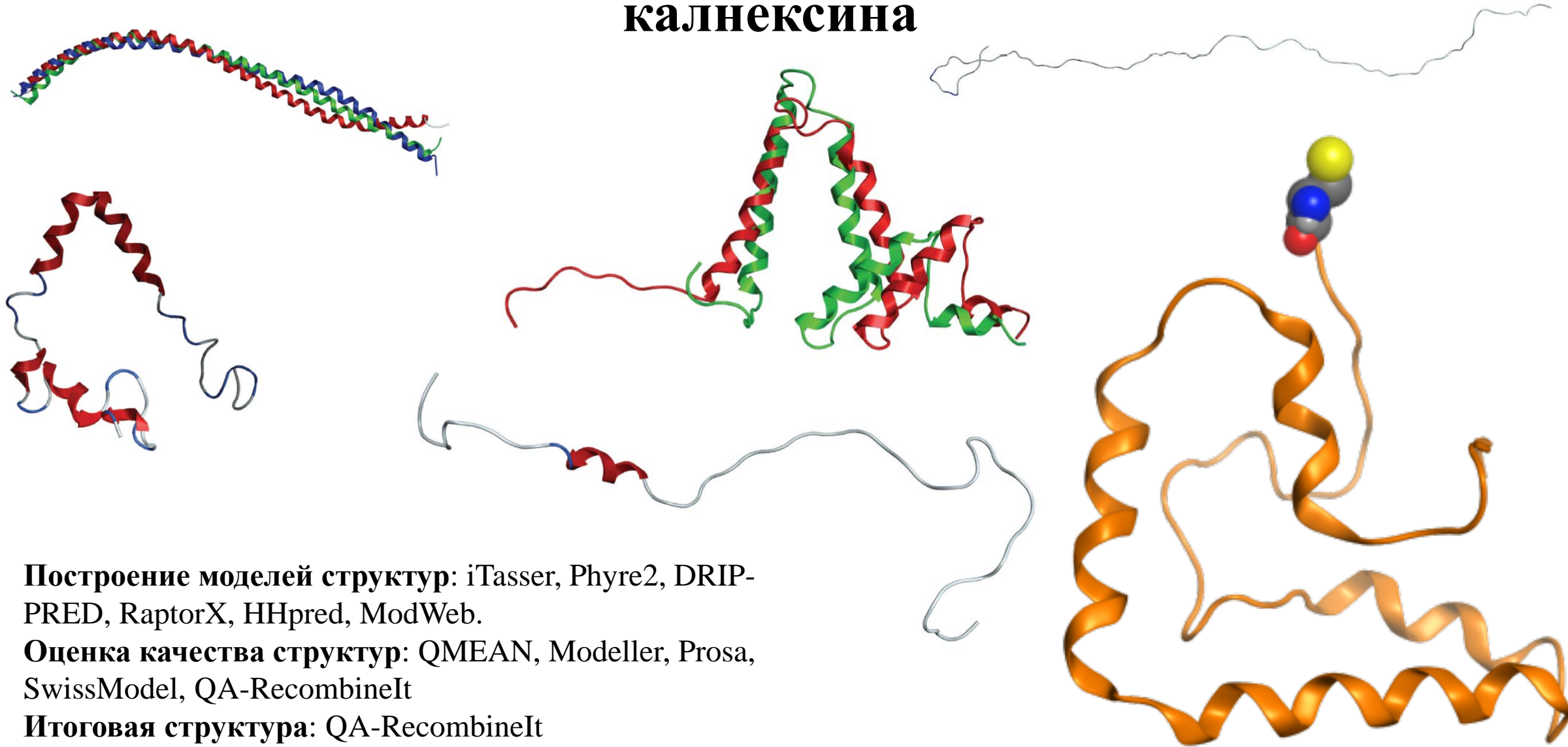
Nef нарушает взаимодействие ABCA1 с калнексином

1. Калнексин взаимодействует с ABCA1
2. Nef нарушает взаимодействие ABCA1 с калнексином
3. Nef взаимодействует с калнексином
4. Предложена модель взаимодействия, в которой в ВИЧ-инфицированных клетках Nef связывается с калнексином и нарушает взаимодействие калнексин-ABCA1, что приводит к удержанию ABCA1 в ER и последующей деградации, предположительно протеасомами. Nef также может способствовать интернализации поверхностного ABCA1 и его деградации, предположительно в лизосомах.



Jennelle, L., Hunegnaw, R., Dubrovsky, L., Pushkarsky, T., Fitzgerald, M. L., Sviridov, D., Popratiloff, A., Brichacek, B. and Bukrinsky, M. (2014) HIV-1 Protein Nef Inhibits Activity of ATP-binding Cassette Transporter A1 by Targeting Endoplasmic Reticulum Chaperone Calnexin. J. Biol. Chem. 289, 28870–28884

Моделирование 3D структуры цитоплазматического домена калнексина

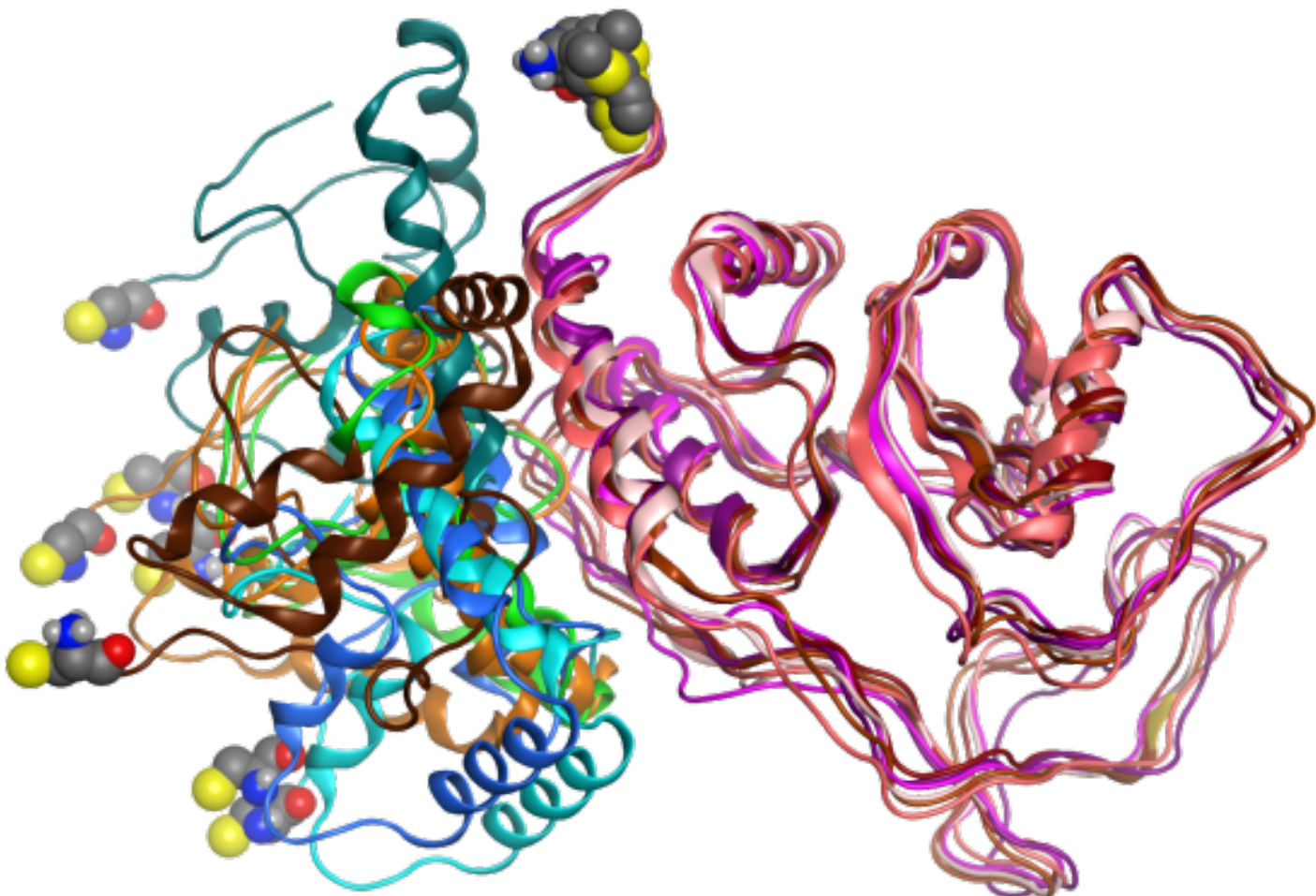


Построение моделей структур: iTasser, Phyre2, DRIP-PRED, RaptorX, HHpred, ModWeb.

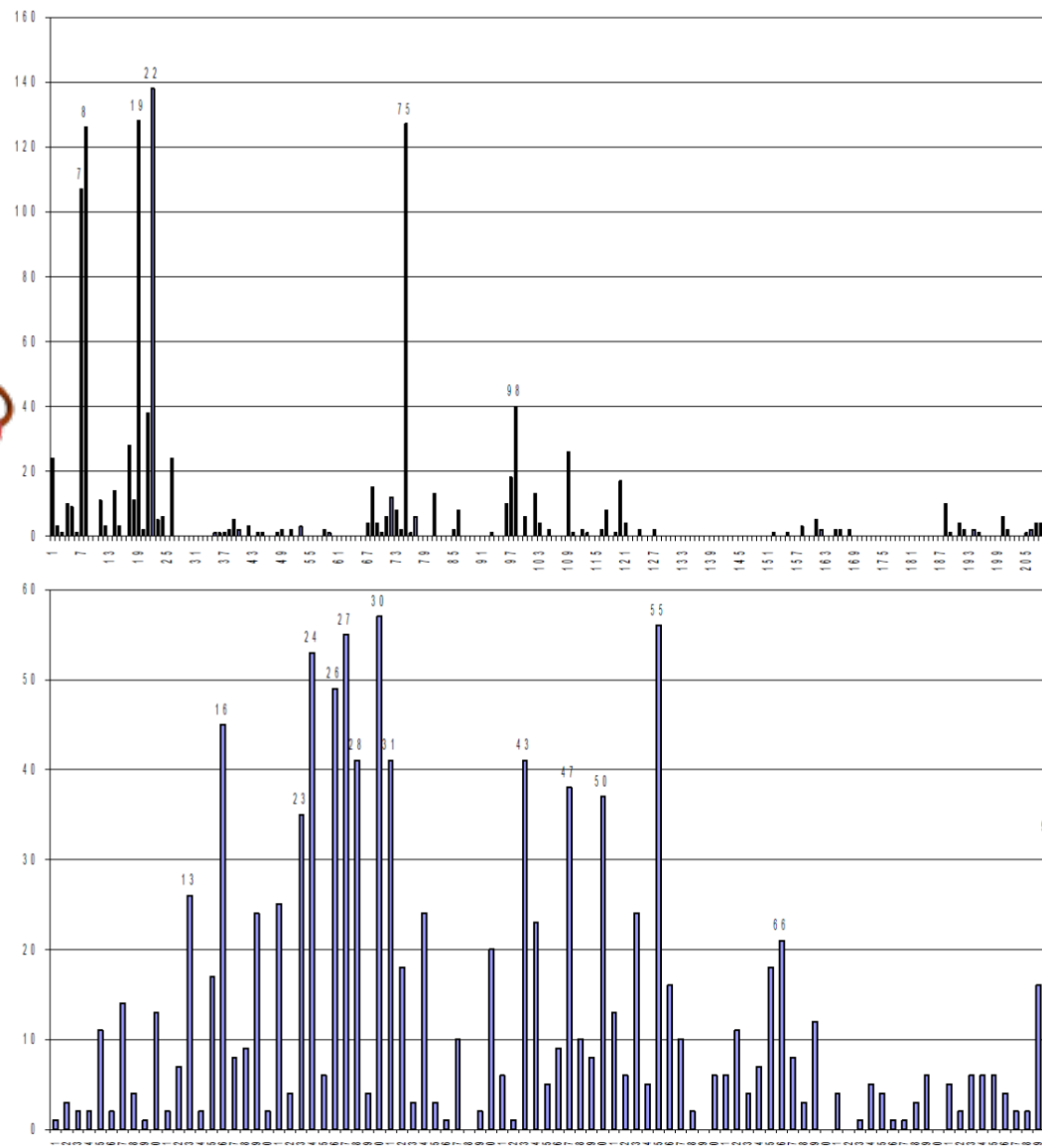
Оценка качества структур: QMEAN, Modeller, Prosa, SwissModel, QA-RecombineIt

Итоговая структура: QA-RecombineIt

Моделирование структуры комплекса Nef-калнексин



Для докинга использовались серверы SwarmDock, Hex, GRAMM-X, Zdock Cluspro. С помощью каждого сервера были получены предсказания структуры комплекса Nef - CNX двумя способами: рассматривая каждый белок как лиганд и как рецептор. По каждому предсказанию были отобраны 10 лучших моделей.



QASDOM: Assessment of Docking Models

Show log

Go back

Model	S	S Atomic	RC	RC Atomic	Cluster
zdock_model10	0.2124	0.4132	26	519	14 Y >
zdock_model7	0.2022	0.3294	23	388	4 O >
zdock_model8	0.2012	0.4002	24	469	14 Y >
cluspro_model3	0.1941	0.1194	28	173	8 S >
zdock_model2	0.1819	0.3293	23	423	6 Q >
zdock_model1	0.1707	0.2944	26	455	13 X >
gramm_x_model5	0.1677	0.1928	20	258	6 Q >
gramm_x_model2	0.1626	0.2196	16	263	4 O >
swarm_dock_model9	0.1616	0.0864	20	123	8 S >
cluspro_model4	0.1575	0.0989	16	125	4 O >
swarm_dock_model1	0.1524	0.0875	24	137	6 Q >
zdock_model3	0.1474	0.3585	27	616	15 Z >
zdock_model5	0.1413	0.2823	25	475	15 Z >
zdock_model9	0.1250	0.2468	14	296	13 X >
zdock_model6	0.1189	0.2716	22	527	7 R >
gramm_x_model7	0.1169	0.1883	31	485	17 b >
cluspro_model8	0.1159	0.0987	25	274	5 P >
cluspro_model1	0.1118	0.0622	19	125	7 R >
cluspro_model7	0.1108	0.0818	20	170	12 W >
swarm_dock_model4	0.1067	0.0582	23	145	5 P >
gramm_x_model8	0.1047	0.1303	22	338	9 T >
gramm_x_model10	0.1026	0.1352	40	541	18 c >
zdock_model4	0.1006	0.2095	22	462	9 T >
cluspro_model5	0.1006	0.0916	14	148	7 R >
swarm_dock_model6	0.1006	0.0574	18	129	5 P >

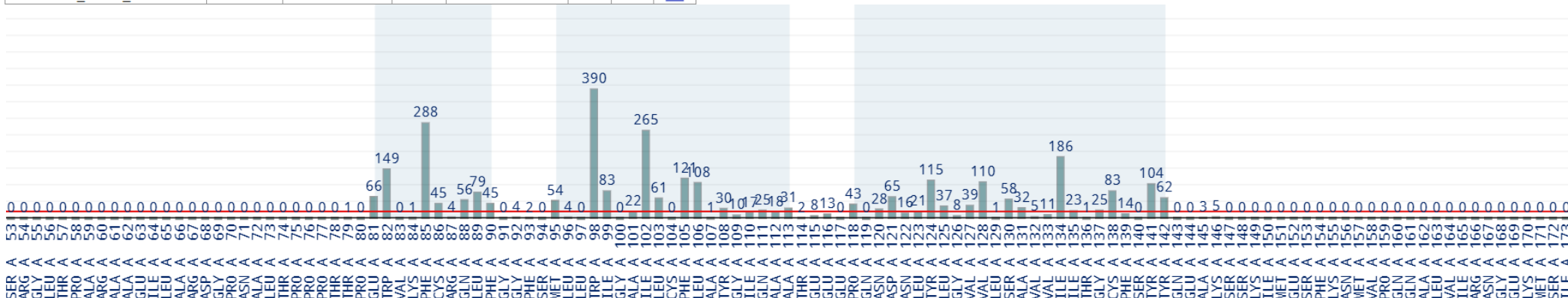
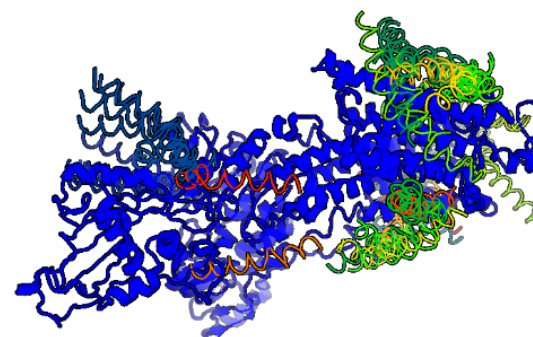
Graphics results

Text results

Ligand	2mlt A.pdb
Receptor	3B8E A.pdb
All Models	All models

qasdom.eimb.ru

Allmodels

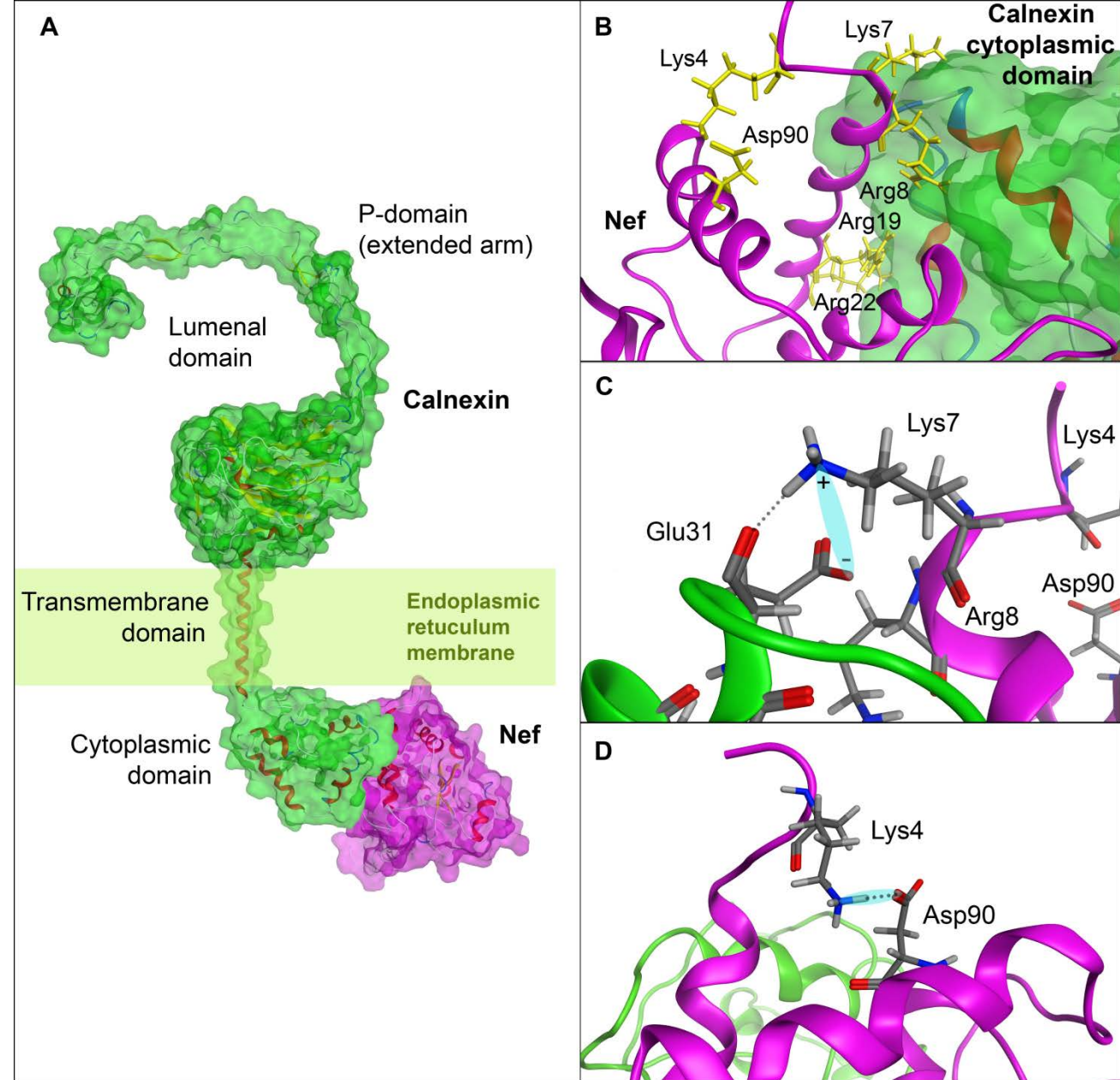


Anashkina, Anastasia A., Yuri Kravatsky, Eugene Kuznetsov, Alexander A. Makarov, and Alexei A. Adzhubei. "Meta-server for automatic analysis, scoring and ranking of docking models." *Bioinformatics* 34, no. 2 (2018): 297-299.

Итоговая модель взаимодействия Nef-калнексин

- Замена одновременно Lys4 и Lys7 в экспериментах по мутагенезу приводит к структурным перестройкам в N-концевой области Nef и нарушает связывание Nef и калнексина
- Белок Nef миристилируется по остатку Gly2
- Цитоплазматический домен калнексина С-концом должен касаться мембраны.
- Cys502 и Cys503 калнексина (С-конец цитоплазматического домена) пальмитилируются.

Интерфейс взаимодействия образован N-концевой альфа-спиралью Nef, Lys7 и Arg 8, 19, 22, взаимодействующими с калнексином. Lys7 и Arg19 высококонсервативны среди последовательностей HIV.

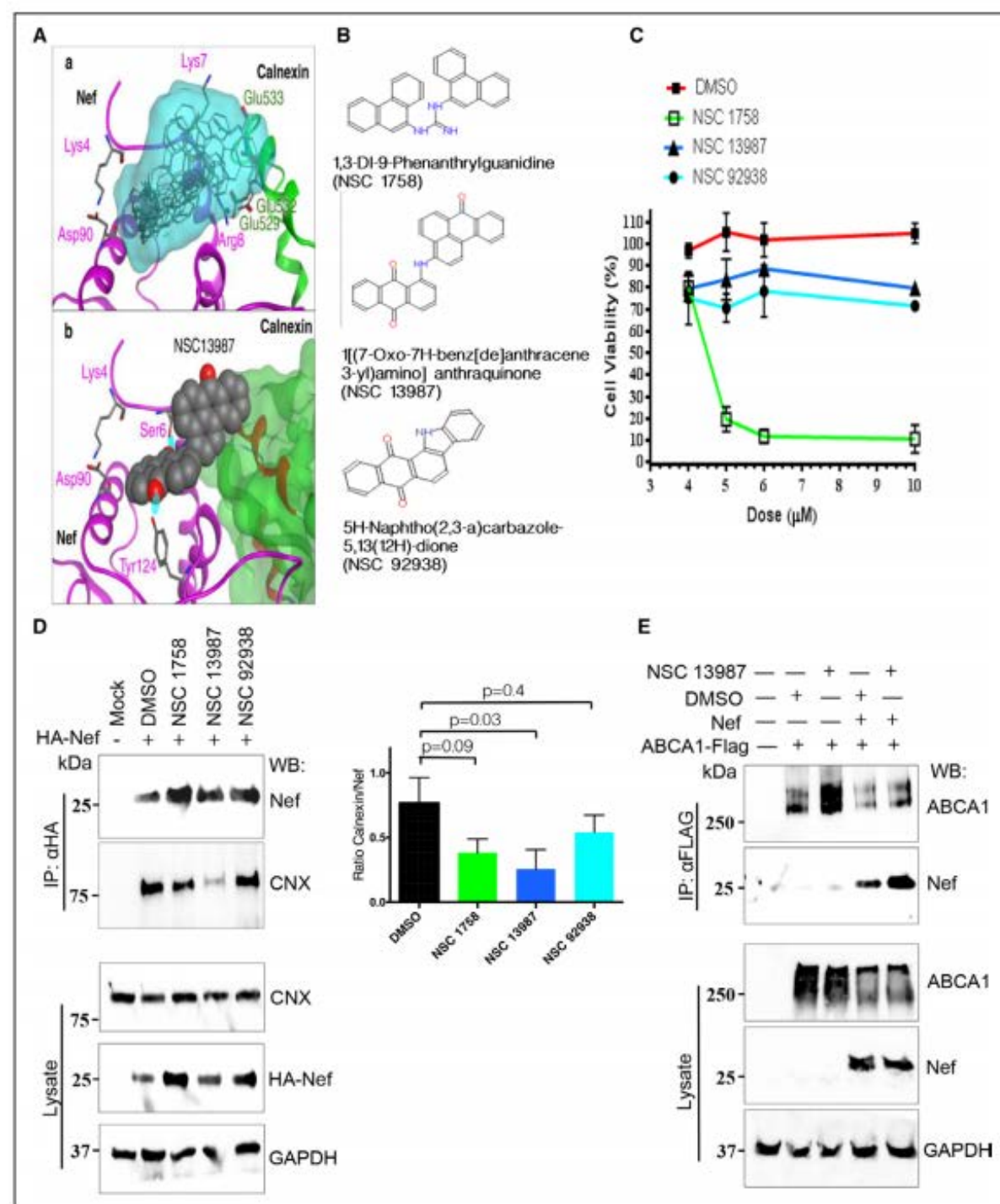


Hunegnaw, Ruth, Marina Vassylyeva, Larisa Dubrovsky, Tatiana Pushkarsky, Dmitri Sviridov, Anastasia A. Anashkina, Aykut Üren et al. "Interaction between HIV-1 Nef and calnexin: From modeling to small molecule inhibitors reversing HIV-induced lipid accumulation." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 36, no. 9 (2016): 1758-1771.

Виртуальный скрининг программой Vina Autodock

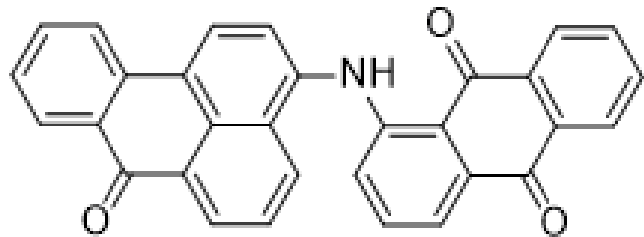
Виртуальный скрининг был проведен на соединениях из набора данных Zinc NCI Plated 2007 программой Vina Autodock к сайту на белке Nef, включающему аминокислотные остатки Lys4 и Lys7. Три соединения, показавшие наилучшую аффинность, были проверены экспериментально. Было показано, что соединение NSC13987 нормализует холестериновый обмен, нарушенный белком Nef ВИЧ-1, снижая образование пенных клеток в культуре ВИЧ-инфицированных макрофагов.

Hunegnaw, Ruth, Marina Vassilyeva, Larisa Dubrovsky, Tatiana Pushkarsky, Dmitri Sviridov, Anastasia A. Anashkina, Aykut Üren et al. "Interaction between HIV-1 Nef and calnexin: From modeling to small molecule inhibitors reversing HIV-induced lipid accumulation." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 36, no. 9 (2016): 1758-1771.

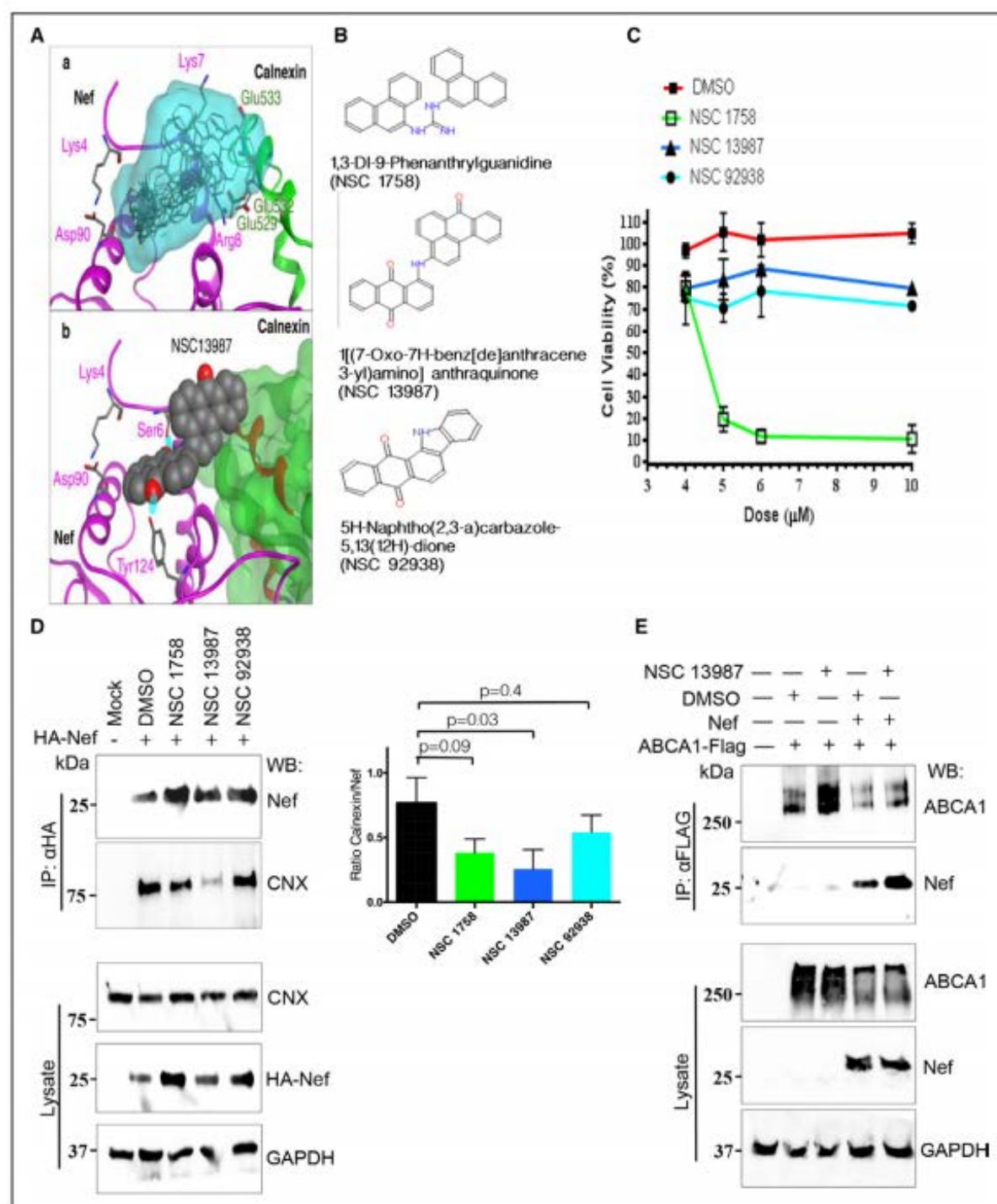


Виртуальный скрининг программой Vina Autodock

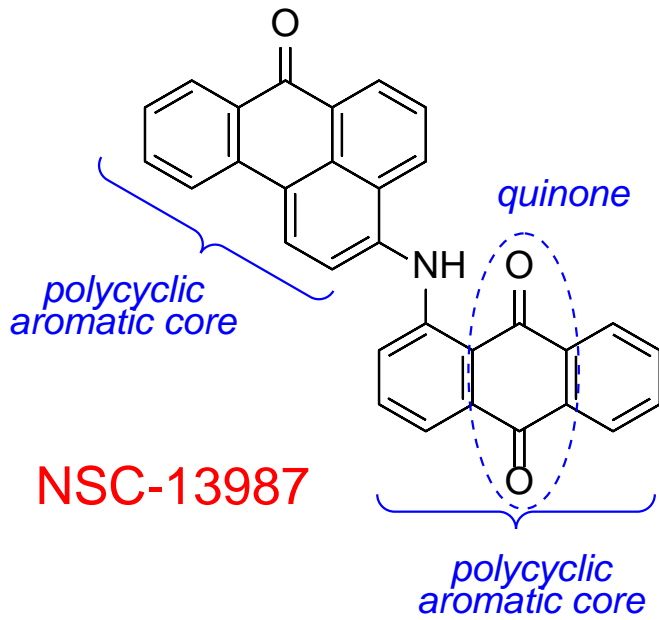
Виртуальный скрининг был проведен на соединениях из набора данных Zinc NCI Plated 2007 программой Vina Autodock к сайту на белке Nef, включающему аминокислотные остатки Lys4 и Lys7. Три соединения, показавшие наилучшую аффинность, были проверены экспериментально. Было показано, что соединение NSC13987 нормализует холестериновый обмен, нарушенный белком Nef ВИЧ-1, снижая образование пенных клеток в культуре ВИЧ-инфицированных макрофагов.



Hunegnaw, Ruth, Marina Vassilyeva, Larisa Dubrovsky, Tatiana Pushkarsky, Dmitri Sviridov, Anastasia A. Anashkina, Aykut Üren et al. "Interaction between HIV-1 Nef and calnexin: From modeling to small molecule inhibitors reversing HIV-induced lipid accumulation." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 36, no. 9 (2016): 1758-1771.



Модификации NSC-13987



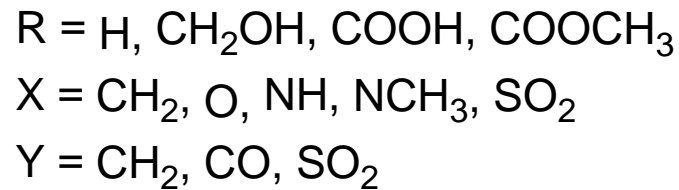
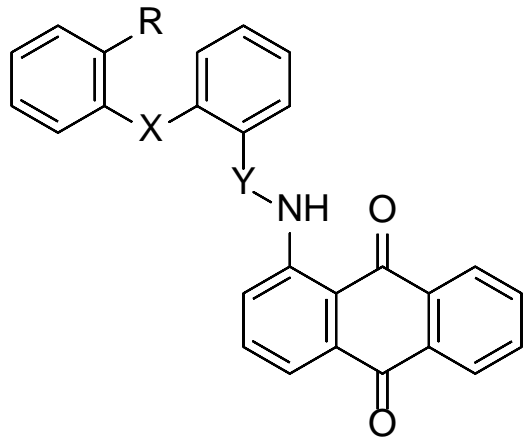
- Polycyclic aromatic nucleus and the presence of a quinone moiety is not considered a good starting point as a lead molecule for drug development, also it is a challenging target synthetically.
- Pharmacophore refinement via elimination of two or more aromatic rings and replacing them with hydrophilic moieties may improve their binding to NEF, impart beneficial pharmacokinetic properties and assist in the development of a general route for the chemical synthesis of NSC-13987 analogs.

Необходимые изменения NSC-13987:

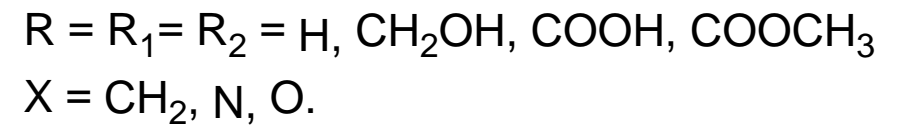
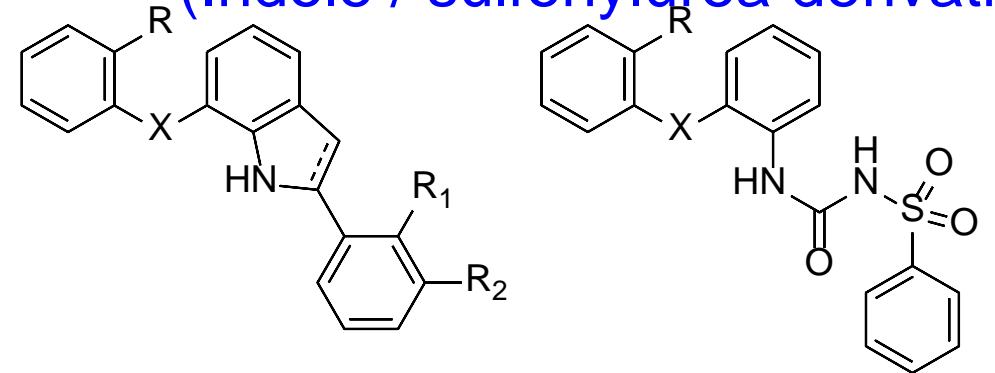
- удаление его ароматических колец
- добавление функциональных групп, которые улучшат растворимость в водной среде.

Модификации NSC-13987

Scaffold 1: Changes to tetracyclic core (Anthraquinone derivatives)



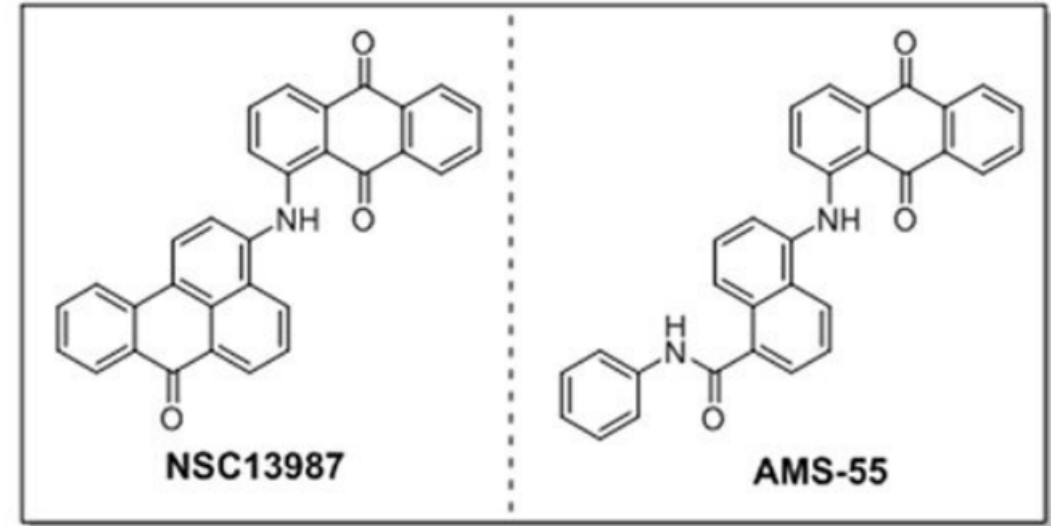
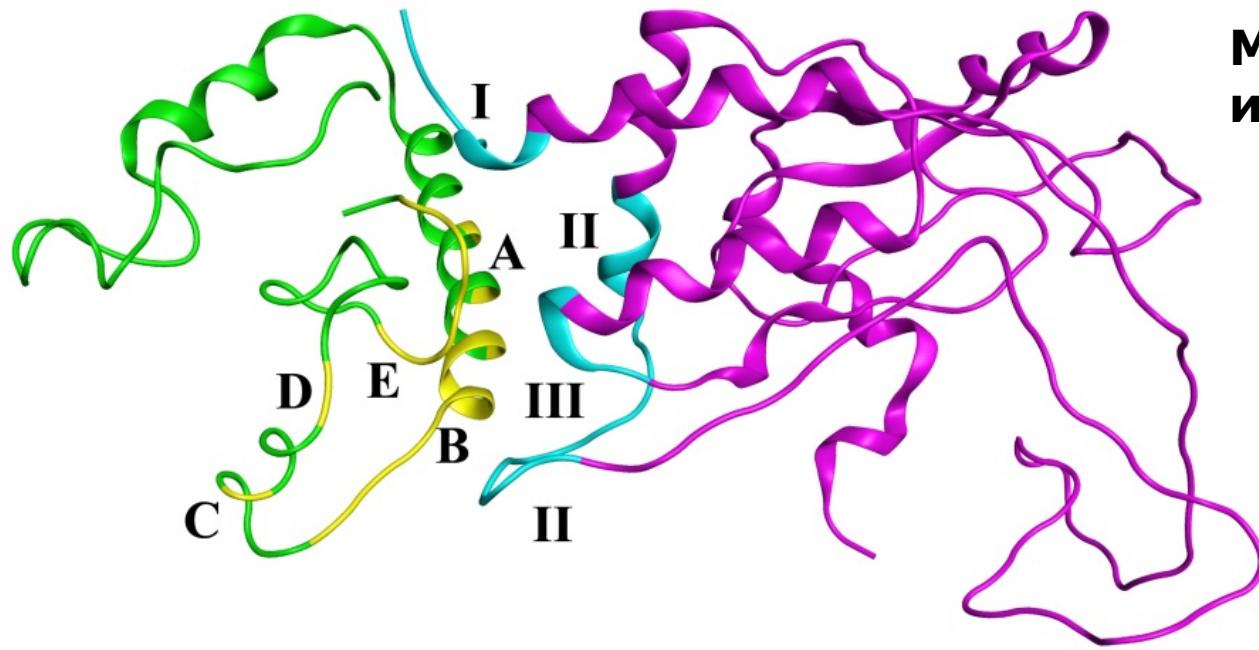
Scaffold 2: Changes to tricyclic core (Indole / sulfonyleurea derivatives)



Вопросы:

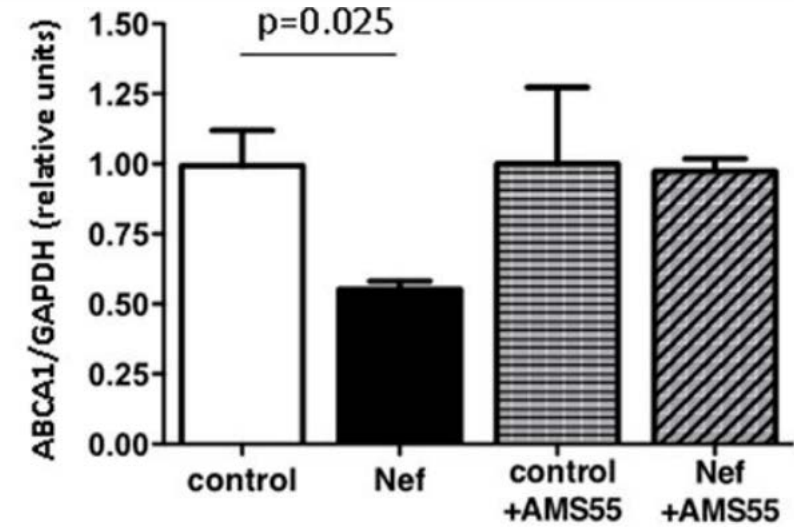
1. Замена каких ароматических колец в NSC13987 является наименее критичной для его биологической активности?
2. Важен ли основной вторичный амин для активности?
3. Можно ли заменить его карбоксамидом или сульфаниламидом?
4. Можно ли добавить сульфонилмочевину в качестве линкера между двумя ароматическими ядрами?

Моделирование взаимодействия между Nef и калнексином



Nef interaction sites			
	I	II	III
	1-MGGKWSKRS-9	75-RPQVPLRPMTYKAALD-90	121-TQGY-124

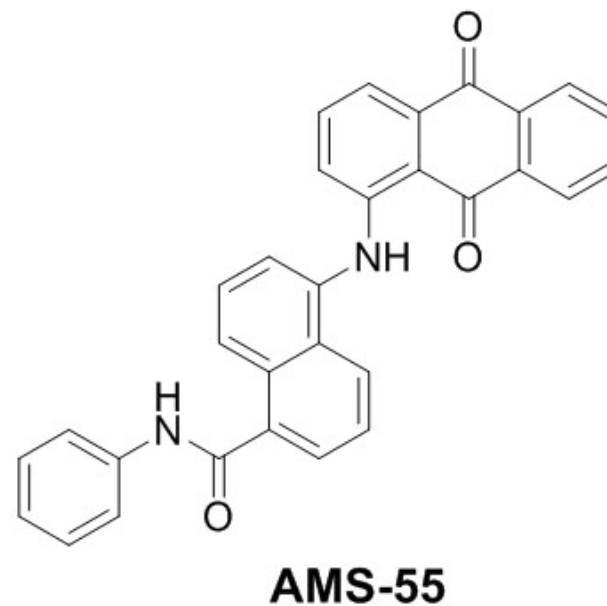
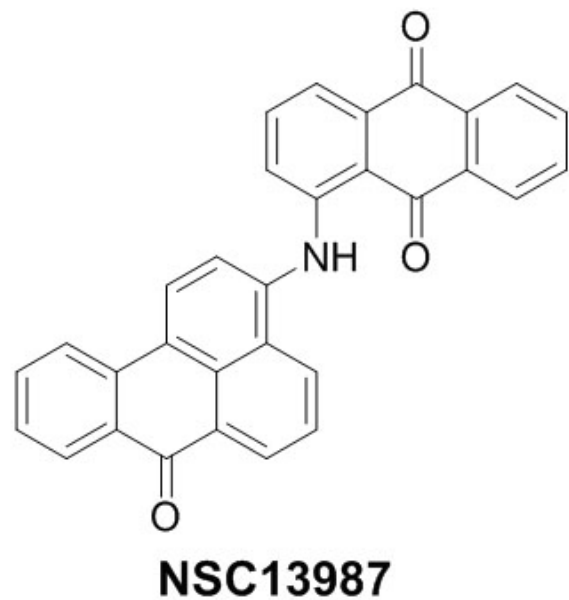
Calnexin interaction sites	Nef interaction sites			
		I	II	III
A	548L, 551K	75	7	10
B	555-DAEEDGGTV-563	90	314	131
C	568E	0	14	0
D	573K	13	12	
E	585-RNRKPR-590	113	60	



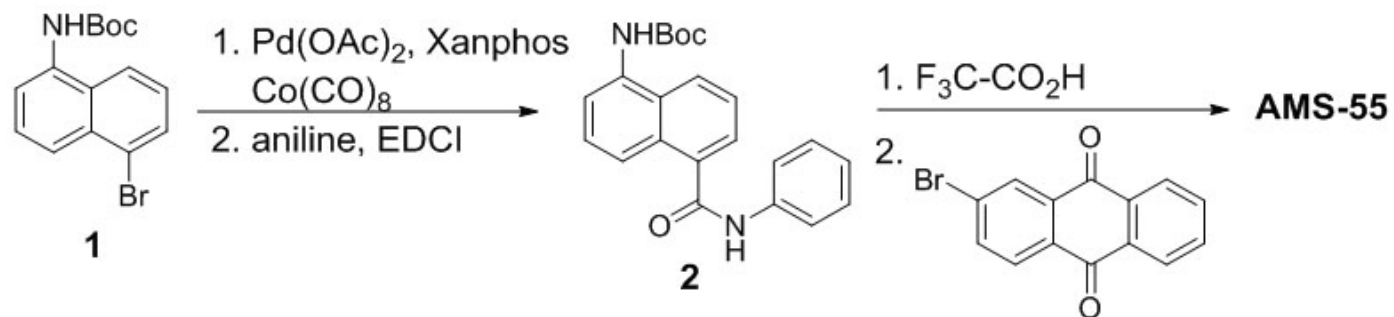
Adzhubei, Alexei A., Anastasia A. Anashkina, Yaroslav V. Tkachev, Yury V. Kravatsky, Tatiana Pushkarsky, Amol Kulkarni, Alexander A. Makarov, and Michael I. Bukrinsky. "Modelling interaction between HIV-1 Nef and calnexin." *AIDS (London, England)* 32, no. 15 (2018): 2103.

Схема химического синтеза AMS-55

A



B



Взаимодействие цитоплазматического домена калнексина с Nef и ингибирование соединениями NSC13987 и AMS55

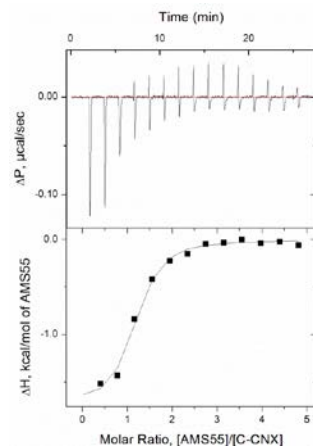
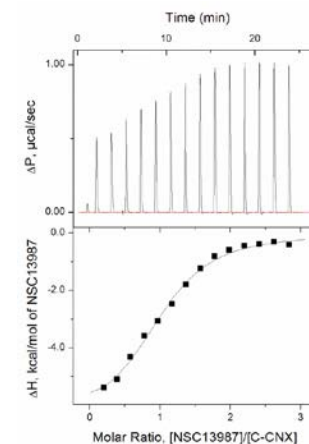
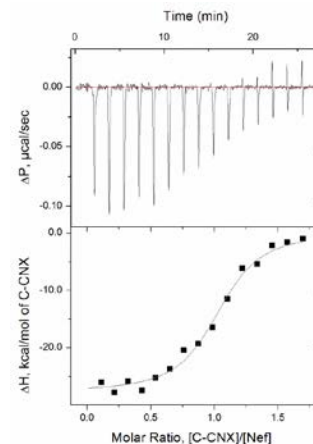
Константы диссоциации комплексов, определенные методом изотермической титрующей калориметрии (ИТС).

complex	Kd, nM
C-CNX:Nef	47
C-CNX:Nef K4A/K7A	19
C-CNX:Nef K4A/K7A/K8A	32
Nef:NSC13987	nd
Nef:AMS55	nd
C-CNX:NSC13987	1000
C-CNX:AMS55	3000
(C-CNX:NSC13987):Nef	nd
(C-CNX:AMS55):Nef	nd

Nef образует сильный эквимоллярный комплекс с калнексином и остатки Nef Lys 4,7 и 8 не участвуют в этом взаимодействии

NSC13987 и AMS55 взаимодействуют с калнексином

NSC13987 и AMS55 мешают Nef взаимодействовать с калнексином



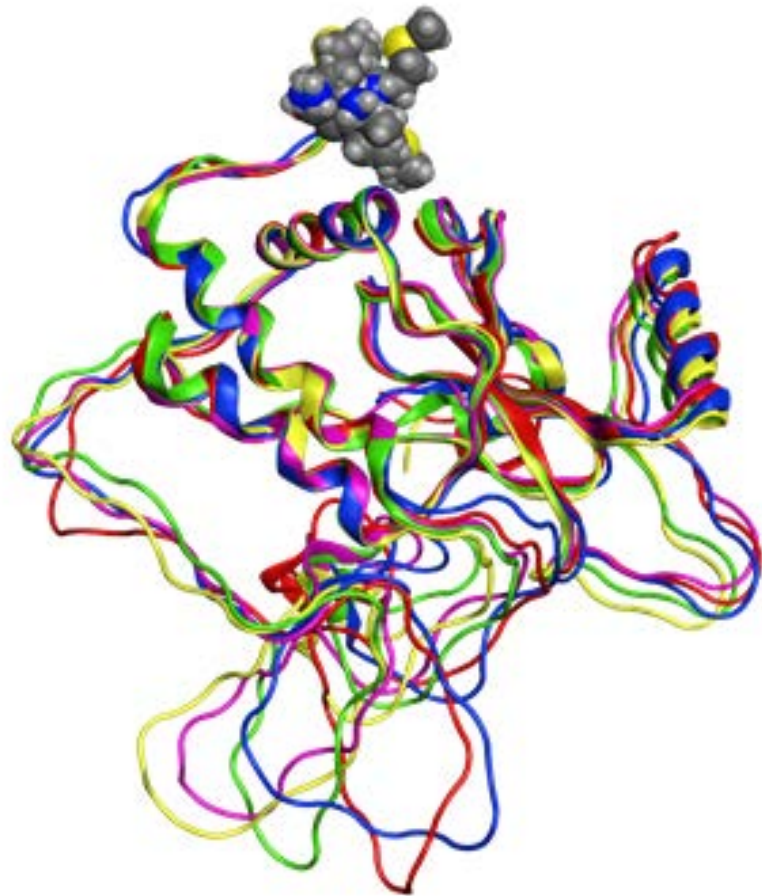
Модель цитоплазматического домена калнексина



Модель калнексина с двуслойной липидной мембраной POPC

Ранее построенная модель цитоплазматического домена калнексина (CNXcd) была слита с α -спиральным трансмембранным доменом, сгенерированным с использованием PeptideBuilder [PeptideBuilder], и предварительно уравновешена бислоем, состоящим из 166 молекул 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолина (POPC). Полноатомная двухслойная модель была построена с использованием charmm-gui [CHARMM-GUI]. Система была сольватирована в элементарной ячейке размером 70x70x120 Å, минимизирована и уравновешена в течение 24 нс. Было проведено моделирование для получения траектории 100 нс, из которых последние 60 нс должны были идентифицировать стабильные кластеры конформаций остова CNXcd с помощью анализа главных компонент и метода DBSCAN [DBSCAN]. Соответствие с наименьшим среднеквадратичным отклонением от среднего значения кластера было выбрано из наибольшего кластера.

Модель Nef



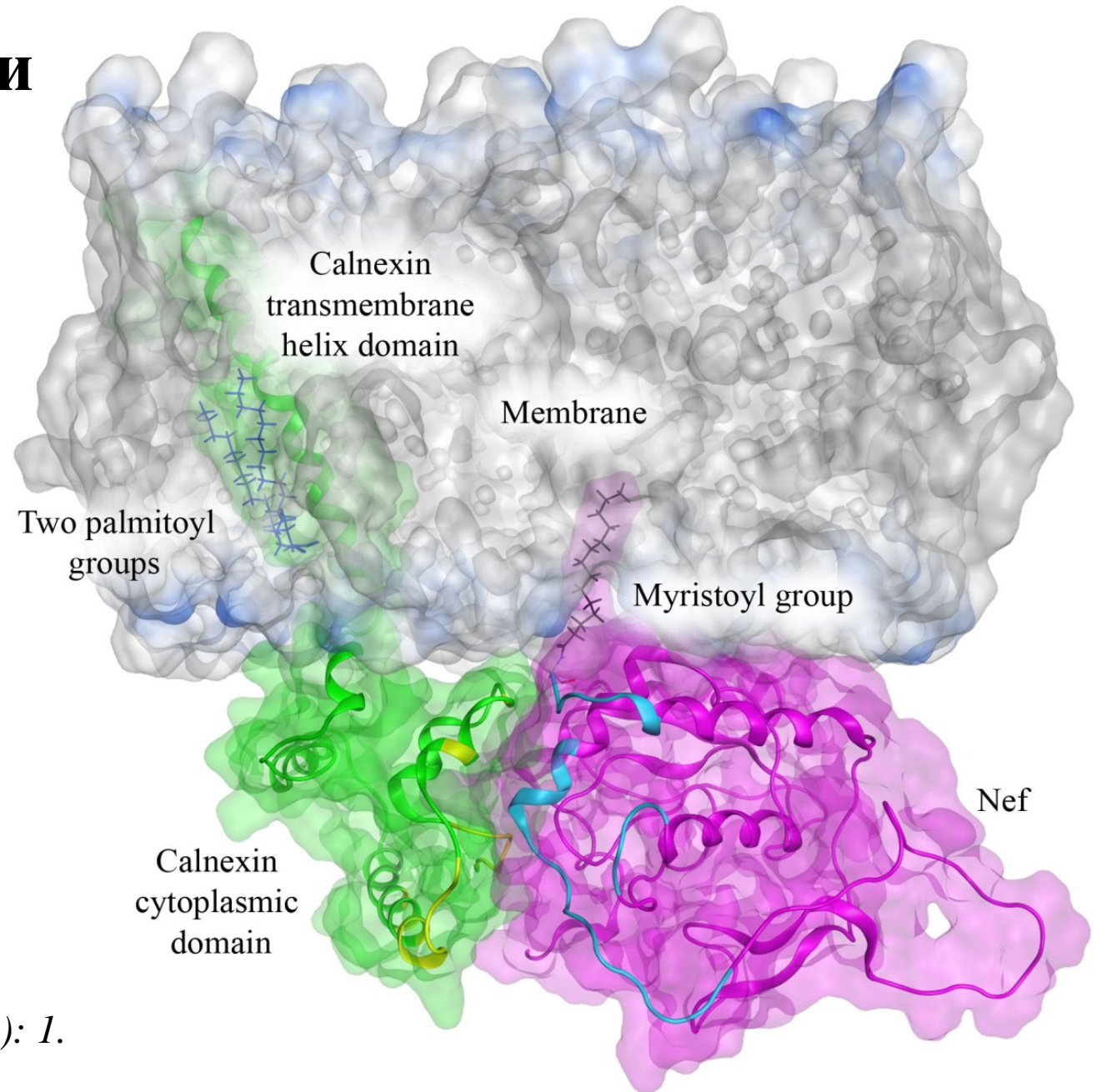
RMSD = 2.747 Å

	1	2	3	4	5	
1: A_conf.pdb_1.N	0.00	3.36	2.26	3.25	3.61	4.0
2: B_conf.pdb_1.N	3.36	0.00	2.85	1.80	2.02	3.5
3: C_conf.pdb_1.N	2.26	2.85	0.00	2.83	3.08	3.0
4: F_conf.pdb_1.N	3.25	1.80	2.83	0.00	1.60	2.5
5: G_conf.pdb_1.N	3.61	2.02	3.08	1.60	0.00	2.0
						1.5
						1.0
						0.5
						0.0

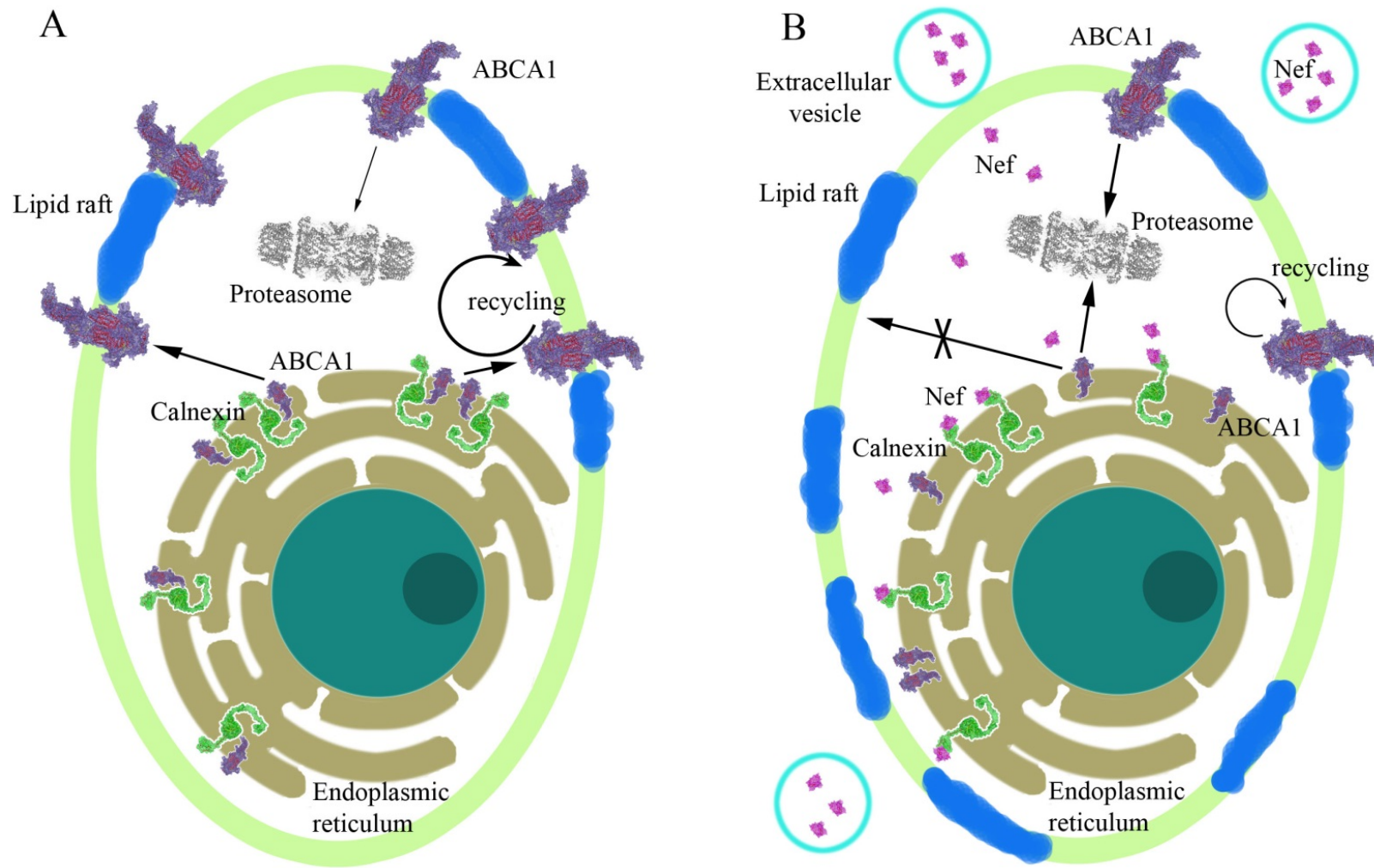
Модель белка NEF, построенная нами ранее, была уточнена методом молекулярной динамики (MD). Из статистического анализа полученной траектории было найдено 5 кластеров конформаций остова, причем конформации A, B и C были наиболее заселенными, а конформации F и G наиболее плотными. Разница между конформациями заключается в разных конформациях петель, вследствие их высокой подвижности.

Улучшенная модель взаимодействий между Nef и кальнексином

- Посттрансляционные модификации
- Модель мембраны
- Молекулярная динамика



Sviridov, Dmitri, Nigora Mukhamedova, Alexander A. Makarov, Alexei Adzhubei, and Michael Bukrinsky. "Comorbidities of HIV infection: Role of Nef-induced impairment of cholesterol metabolism and lipid raft functionality." AIDS (London, England) 34, no. 1 (2020): 1.

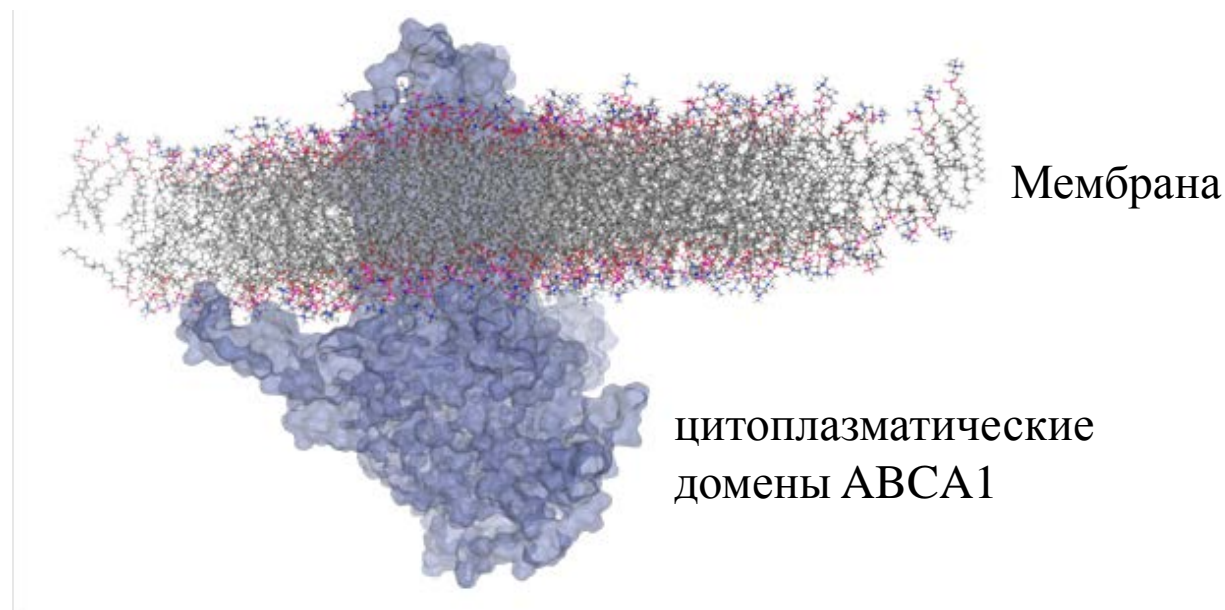


(A) Клетка без Nef. ABCA1 созревает в ЭР с помощью калнексина и отправляется в цитоплазматическую мембрану, где осуществляет холестериновый обмен. ABCA1 рециклирует из клеточной мембраны и небольшое количество попадает в протеасому и деградирует.

(B) Внеклеточные везикулы (EV) доставляют молекулы Nef в клетку. Nef взаимодействует с цитоплазматическим доменом калнексина, нарушая взаимодействие его люменального домена с ABCA1. Это нарушает созревание ABCA1 и приводит к деградации большей части ABCA1 в протеасомах. Уменьшение числа молекул ABCA1 в клеточной мембране приводит к увеличению количества липидных рафтов.

- Везикулы, содержащие Nef, изменяют метаболизм холестерина в неинфицированных клетках путем ингибирования активности ABCA1 и подавления выхода холестерина из клетки
- Нарушение выброса холестерина нарушает доставку холестерина в олигодендроциты и влияет на миелинизацию аксонов
- Подавление активности ABCA1 приводит к увеличению липидных рафтов в клетке
- Увеличение числа липидных рафтов способствует воспалению путем усиления ответа на воспалительные стимулы
- Везикулы Nef вызывают ‘обученную память’ в миелоидных клетках, имеющих про-воспалительный фенотип
- Соединения, блокирующие воздействие Nef на ABCA1, восстанавливают нормальную работу клеток

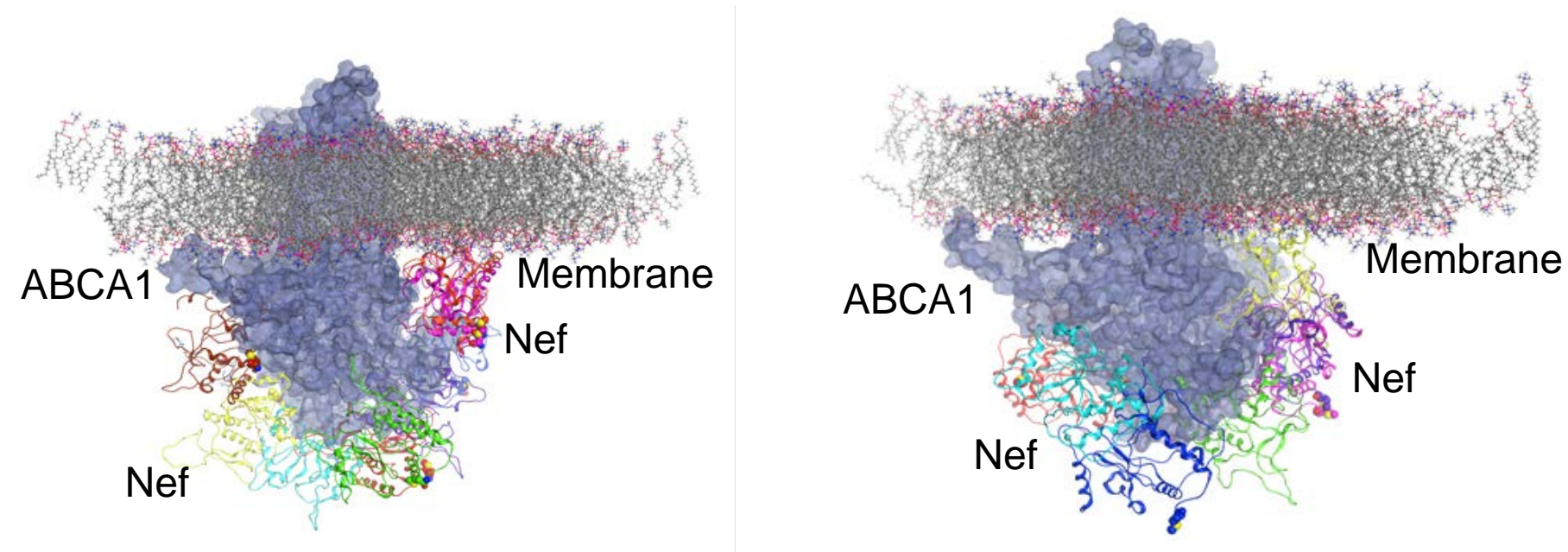
Модель ABCA1



ABCA1 с липидным бислоем POPC

Модельная структура, содержащая цитоплазматические и трансмембранные домены ABCA1, была помещена в бислой, состоящий из 312 молекул 1-пальмитоил-2-олеил-фосфатидилхолина (POPC), используя charmm-gui Membrane Builder. Аминокислотные остатки внеклеточных доменов 49-623 и 1371-1635 были удалены и соединены гибким линкером. Система была помещена в гексагональную ячейку (125x125x125Å), сольватирована водой TIP3P водой, ионизована NaCl 0.15M, сводится к минимуму с использованием минимизатора наискорейшего спуска, а затем уравнивается с использованием сочетания температуры и давления Берендсена. Для производственного цикла длиной 60 нс ансамбль NPT моделировался с использованием температурной связи Носа-Гувера и полуизотропного метода парринелло-рамановского давления. Температура во время симуляции была 310K. Моделирование проводилось с использованием полного атомного силового поля CHARMM36 с использованием программного обеспечения GROMACS.

Моделирование взаимодействия между Nef и ABCA1 – результаты докинга



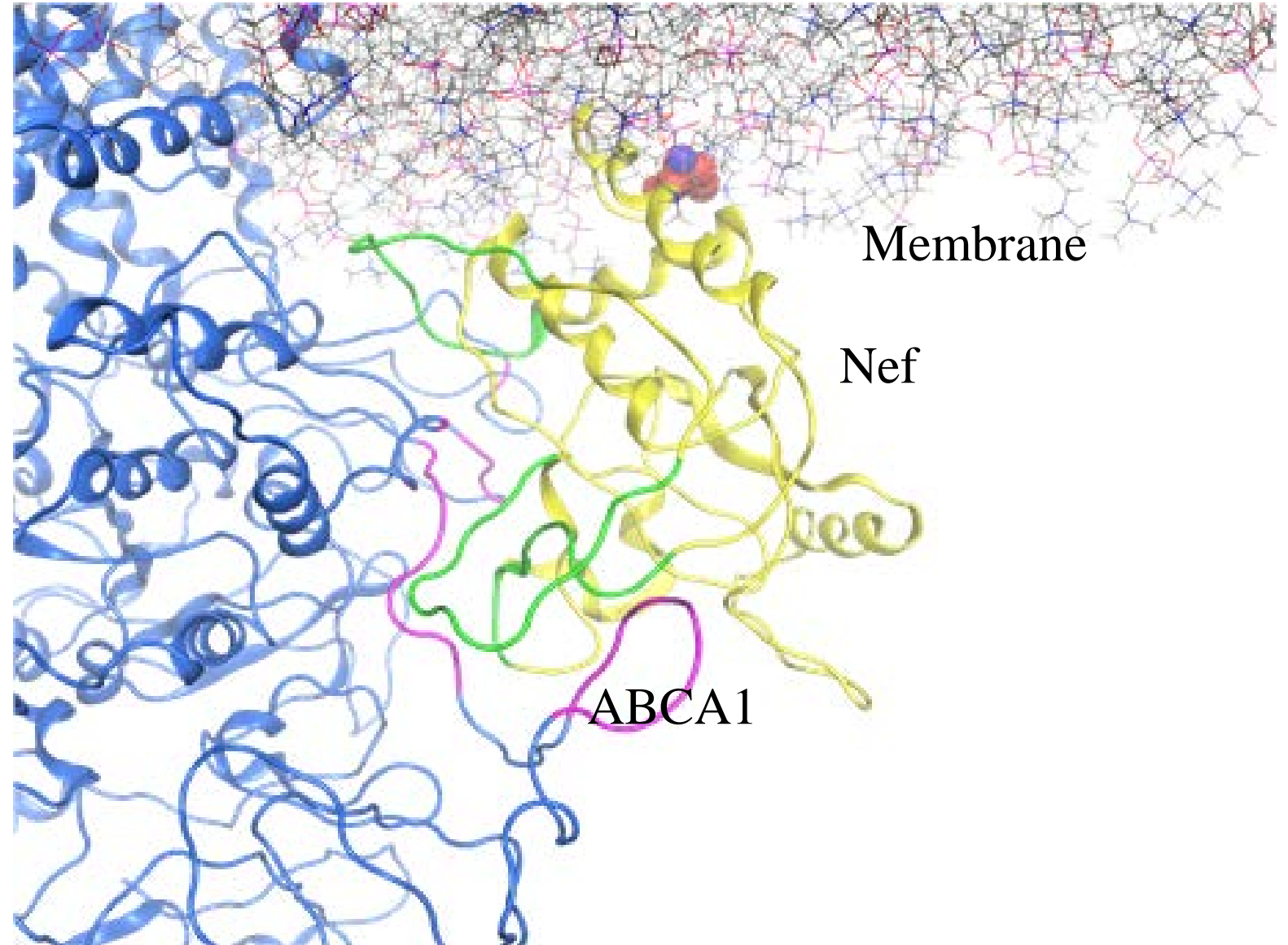
- Молекулы Nef расположены в сайтах, предсказанных методом глобального докинга
- Из всех моделей была выбрана модель, в которой Nef связан с мембраной

Моделирование взаимодействия между Nef и ABCA1 – результаты докинга и виртуального скрининга

Мы выбрали модель докинга, в которой Nef связана остатком с мембраной через липидный якорь на остатке Gly2 (остаток миристиловой кислоты)

Ранее было показано, что взаимодействие ABCA1–Nef требует мембранной локализации Nef (PLoS Biol. 2006)

В данное время проходит виртуальный скрининг сайтов связывания ABCA1 и Nef этой модели



Публикации

1. Jennelle, L., Hunegnaw, R., Dubrovsky, L., Pushkarsky, T., Fitzgerald, M. L., Sviridov, D., Popratiloff, A., Brichacek, B. and Bukrinsky, M. (2014) HIV-1 Protein Nef Inhibits Activity of ATP-binding Cassette Transporter A1 by Targeting Endoplasmic Reticulum Chaperone Calnexin. *J. Biol. Chem.* 289, 28870–28884
2. Hunegnaw, Ruth, Marina Vassylyeva, Larisa Dubrovsky, Tatiana Pushkarsky, Dmitri Sviridov, Anastasia A. Anashkina, Aykut Üren et al. "Interaction between HIV-1 Nef and calnexin: From modeling to small molecule inhibitors reversing HIV-induced lipid accumulation." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 36, no. 9 (2016): 1758-1771.
3. Anashkina, Anastasia A., Yuri Kravatsky, Eugene Kuznetsov, Alexander A. Makarov, and Alexei A. Adzhubei. "Meta-server for automatic analysis, scoring and ranking of docking models." *Bioinformatics* 34, no. 2 (2018): 297-299.
4. Adzhubei, Alexei A., Anastasia A. Anashkina, Yaroslav V. Tkachev, Yury V. Kravatsky, Tatiana Pushkarsky, Amol Kulkarni, Alexander A. Makarov, and Michael I. Bukrinsky. "Modelling interaction between HIV-1 Nef and calnexin." *AIDS (London, England)* 32, no. 15 (2018): 2103.
5. Sviridov, Dmitri, Nigora Mukhamedova, Alexander A. Makarov, Alexei Adzhubei, and Michael Bukrinsky. "Comorbidities of HIV infection: Role of Nef-induced impairment of cholesterol metabolism and lipid raft functionality." *AIDS (London, England)* 34, no. 1 (2020): 1.
6. Патент Adzhubei, Alexei, Michael Bukrinsky, and Ruth Hunegnaw. "Compounds inhibiting nef-calnexin interaction." U.S. Patent Application 16/841,444, filed October 29, 2020.

Спасибо за
внимание!

