

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН НА СТАБИЛЬНОСТЬ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА

Козел В. А.

*студент 4 курса лечебного факультета учреждения образования
«Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Беларусь
vladislavk200302@gmail.com*

Побойнев В. В.

*ассистент кафедры общей химии учреждения образования
«Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Беларусь
dremozzew@mail.ru*

Аннотация. В данной статье проанализировано влияние 437 аминокислотных замен на стабильность вторичной структуры эпидермального фактора роста человека (ЭФРЧ) и на способность ЭФРЧ к структурным переходам с помощью оригинального алгоритма PentUnFOLD. В ходе проведенных *in silico* экспериментов были отобраны аминокислотные замены M21R и M21K, которые вызывают появление IDPRs в ЭФРЧ. Появление IDPRs должно способствовать лучшему взаимодействию белка с его рецептором, что подтверждается термодинамическими расчётами.

Ключевые слова: аминокислотная замена; эпидермальный фактор роста человека; синдром диабетической стопы; алгоритм PentUnFOLD.

EVALUATION OF THE EFFECT OF AMINO ACID SUBSTITUTION ON THE STABILITY OF THE HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR

Kozel V. A.

*the 4th year student of the faculty of general medicine of the
Educational Institution "Belarusian State Medical University",
Minsk, Belarus
vladislavk200302@gmail.com*

Poboinev V. V.

*assistant professor of the Department of General chemistry
of the Educational Institution «Belarusian State Medical University»,
Minsk, Belarus
dremozzew@mail.ru;*

In this article we have analyzed the effect of 437 amino acid substitutions on the stability of the secondary structure of human epidermal growth factor (human EGF) and on the ability of human EGF to structural shifts using the original PentUnFOLD algorithm. As the results of the conducted in silico experiments the amino acid substitutions M21R and M21K were selected, which cause the appearance of IDPRs in human EGF. The appearance of IDPRs should contribute to a better interaction of the protein with its receptor, which is also confirmed by thermodynamic calculations.

Key words: *amino acid substitution; human epidermal growth factor; diabetic foot syndrome; PentUnFOLD algorithm*

В Республике Беларусь на 1 января 2021 г. на диспансерном учёте находилось 356 945 пациентов с сахарным диабетом (СД), в том числе с СД 1 типа – 18 110 человек, СД 2 типа – 330 957 человек. В общей структуре распространённости в Беларуси СД 2-го типа занимает 94% [1]. Заболеваемость сахарным диабетом в Беларуси ежегодно увеличивается на 8-10%. Синдром диабетической стопы (СДС) – патология с выраженными поражениями мягких и костных тканей. В результате поражения периферических нервов и сосудов происходят некротические процессы, проявляющиеся трофическими язвами на поверхности кожи, изменениями в суставах и гнойно-некротическими процессами в мягких и костных тканях. Синдром является осложнением СД и развивается не менее чем у 15% больных [2]. Если своевременно не предпринять меры по лечению СДС, то сильно возрастает риск развития гангрены. На данный момент в мире существует единственный препарат применяемый в лечении СДС – Неберprot-P, содержащий рекомбинантный ЭФРЧ. Использование данного препарата ускоряет заживление глубоких и сложных язв, как ишемических, так и нейропатических, и уменьшает количество ампутаций, связанных с диабетом. Клинические испытания Неберprot-P у пациентов с язвами диабетической стопы показали, что повторная местная инфльтрация этим продуктом может улучшить безопасное и эффективное заживление хронических ран. Однако данный препарат способствует заживлению язв не у всех пациентов, а длительность лечения может продолжаться несколько месяцев. Введение аминокислотной замены (одной или нескольких), увеличивающих аффинность ЭФРЧ к его рецептору, может увеличить его эффективность.

Целью данного исследования является анализ аминокислотных на предмет способности увеличивать вероятность перехода эпидермального фактора роста человека во внутренне неупорядоченное состояние.

Материалы и методы. Объектом исследования в данной работе является аминокислотная последовательность ЭФРЧ, которая была взята из PDB (PDB ID: 1IVO: C) [3]. Влияние аминокислотных замен на стабильность вторичной структуры определяли с помощью алгоритма PentUnFOLD [4]. Алгоритм PentUnFOLD представляет собой принципиально новый вероятностный метод, с помощью которого можно определить фрагменты белка, склонные к различным структурным переходам, в том числе и во внутренне неупорядоченное состояние (IDPRs). Данный алгоритм может работать как с файлом PDB, так и с аминокислотной последовательностью белка. *In silico* мутагенезу подверглись 23 аминокислотных остатка ЭФРЧ, а именно L15, H16, D17, G18, V19, M21, Y22, I23, E24, A25, L26, D27, K28, Y29, Q43, Y44, R45, D46, L47, K48, W49, W50, E51. Указанные аминокислотные остатки менялись на другие 19 возможных варианта, т.е. были проанализированы 437 аминокислотных замен.

Результаты и их обсуждение. Все аминокислотные замены можно разделить на 2 большие группы: первая включает те замены, которые повышают стабильность вторичной структуры белка, а вторая – содержит аминокислотные замены, понижающие его стабильность. Из 437 аминокислотных замен 44 не вызывают абсолютно никаких изменений в стабильности структуры ЭФРЧ при использовании алгоритма PentUnFOLD. К первой группе относится подгруппа аминокислотных замен, повышающих стабильность имеющихся бета-тяжей. Нами было выявлено 76 таких аминокислотных замен. К первой группе мы также отнесли и подгруппу аминокислотных замен, которые повышают стабильность ЭФРЧ за счёт уменьшения вероятности структурного перехода в IDPRs. Таких замен было выявлено 159. В первую группу мы также отнесли аминокислотные замены, которые способствуют структурному переходу койла (петли) в бета-тяж, что также может способствовать не только увеличению стабильности ЭФРЧ, но и его амилоидогенного потенциала. Таких замен обнаружено 107.

Ко второй группе относятся аминокислотные замены, понижающие стабильность бета-тяжей (замены, способствующие переходу стабильного бета-тяжа в нестабильный). Нами было выявлено 53 таких аминокислотных замен: Y22Q, Y22S, Y22T, Y22R, Y22E, Y22N, Y22H, Y22K, Y22D, I23Q, I23S, I23T, I23E, I23N, I23H, I23K, D27G, Y29Q, Y29S, Y29T, Y29N, Y29E, Y29N, Y29H, Y29K, Y29D, Y44G, Y44A, Y44L, Y44P, Y44P, Y44Q, Y44W, Y44S, Y44T, Y44R, Y44E, Y44N, Y44H, Y44K, Y44D, D46P, D46Q, D46R, L47Q, L47S, L47T, L47R, L47E, L47N, L47H, L47K, L47D. К возможному структурному переходу бета-тяжа в койл приводят 22 аминокислотные замены: M21Q, M21T, M21R, M21E, M21H, M21K, M21D, Y29G, Q43G, Q43A, Q43V, Q43I, Q43M, Q43Y,

Y44P, Y44T, Y44R, Y44E, Y44N, Y44H, Y44K, Y44D. Возможности структурного перехода бета-тяжей в IDPRs способствуют 16 аминокислотных замен: L26G, L26A, L26P, K28D, Y29G, Y29A, Y29Q, Y29R, Y29T, Y29E, Y29M, Y29K, Y29D, Y44G, Y44A, R45D. 97 аминокислотных замен уменьшают способность койла к структурному переходу в бета-тяж: L15G, L15A, L15P, L15F, L15Q, L15S, L15T, L15R, L15E, L15N, L15H, L15K, L15D, H16P, Q43G, Q43A, Q43V, Q43L, Q43I, Q43P, Q43F, Q43W, Q43C, Q43M, Y44A, Y44L, Y44P, Y44F, Y44Q, Y44S, Y44T, Y44R, Y44E, Y44N, Y44C, Y44M, Y44H, Y44K, Y44D, R45A, D46A, D46L, D46P, D46Q, D46E, D46N, D46M, D46K, L47G, L47A, L47P, L47Q, L47S, L47T, L47R, L47E, L47N, L47H, L47K, L47D, K48G, K48A, K48V, K48P, K48F, K48N, K48M, K48D, W49G, W49A, W49V, W49L, W49P, W49F, W49Q, W49S, W49T, W49R, W49E, W49N, W49M, W49H, W49K, W49D, W50G, W50A, W50L, W50P, W50F, W50Q, W50S, W50R, W50E, W50N, W50M, W50K, W50D.

По нашей гипотезе введение аминокислотной замены в структуру ЭФРЧ должно увеличивать вероятность перехода имеющихся бета-тяжей в петли и/или в IDPRs, что может увеличивать средство ЭФРЧ к его рецептору а, соответственно, усилить терапевтическое действие лекарственного средства на основе ЭФРЧ. Таких замен было выявлено 30, так как одна и та же аминокислотная замена может одновременно увеличивать склонность бета-тяжей к переходу в койл и в IDPRs: L15S, L15E, M21Q, M21T, M21R, M21E, M21H, M21K, M21D, L26G, L26A, L26P, L26S, L26T, L26D, K28D, Y29G, Y29A, Y29Q, Y29T, Y29R, Y29E, Y29M, Y29K, Y29D, Y44G, Y44A, R45D, L47S, L47D. Из приведенных выше 30 аминокислотных замен всего 3: M21R, M21K, M21Q повышают аффинность ЭФРЧ к рецептору согласно программе mCsM-PPI2 [5]. ΔG аминокислотной замены M21R составляет 0,515 ккал/моль, M21K – 0,244 ккал/моль и M21Q – 0,02 ккал/моль. Учитывая результаты работы алгоритма PentUnFOLD и программы mCsM-PPI2, можно предположить, что только аминокислотные замены M21R и M21K из 437 проанализированных увеличивают вероятность формирования IDPRs в ЭФРЧ, что может приводить к увеличению аффинности данного белка к его рецептору.

Таблица 1 – Стабильность структуры эпидермального фактора роста человека, определённая алгоритмом PentUnFOLD

Нативный ЭФРЧ				M21K/Q		M21R	
№	АК	DSSP	PentUnFOLD 2D	АК	PentUnFOLD 2D	АК	PentUnFOLD 2D
5	Е			Е		Е	
6	С			С		С	
7	Р	С		Р		Р	

8	L	C		L		L	
9	S	C		S		S	
10	H	C		H		H	
11	D	C		D		D	
12	G	C		G		G	
13	Y	C	CE	Y	CE	Y	CE
14	C	E	CE	C	CE	C	CE
15	L	E		L		L	
16	H	C		H		H	
17	D	C		D		D	
18	G	C		G		G	
19	V	C	EN	V	EN\D	V	EN\D
20	C	E	ES	C	ES\D	C	ES\D
21	M	E	ES	K/Q	ES	R	ES
22	Y	E	ES	Y	ES	Y	ES\D
23	I	H	ES\D	I	ES	I	ES
24	E	H		E		E	
25	A	H		A		A	
26	L	H	CH	L	CH	L	CH
27	D	H	CH	D	CH	D	CH
28	K	H	ES\D	K	ES\D	K	ES\D
29	Y	H	EN\D	Y	EN\D	Y	EN\D
30	A	H	EN	A	EN	A	EN
31	C	E	ES	C	ES	C	ES
32	N	E	ES	N	ES	N	ES
33	C	E	ES	C	ES	C	ES
34	V	E	CE	V	CE	V	CE
35	V	E	CE	V	CE	V	CE
36	G	E	CE	G	CE	G	CE
37	Y	E	ES	Y	ES	Y	ES
38	I	C	ES	I	ES	I	ES
39	G	E		G		G	
40	E	E		E		E	
41	R	C		R		R	
42	C	H	CE	C	CE	C	CE
43	Q	H	CE	Q	CE	Q	CE
44	Y	H	ES\D	Y	ES\D	Y	ES\D
45	R	H	ES	R	ES	R	ES

46	D	H	CH	D	CH	D	CH
47	L	H		L		L	
48	K	H	CE	K	CE	K	CE
49	W	H		W		W	
50	W			W		W	
51	E			E		E	

Заключение. Аминокислотные замены M21R и M21K в эпидермальном факторе роста человека увеличивают вероятность формирования IDPRs, что должно приводить к увеличению сродства лиганда к его рецептору. Предлагаемая гипотеза подтверждается и термодинамическими расчётами.

Список литературы

1. Всемирный день борьбы против диабета [Электронный ресурс] / Минский городской клинический наркологический центр. – Электрон. дан. – Режим доступа: <https://gknd.by/edinye-dni-zdorovya-v-2022-godu/913-14-noyabrya-2022-goda-vsemirnyj-den-borby-protiv-diabeta> (дата обращения: 07.08.23).
2. Синдром диабетической стопы [Электронный ресурс] / МЕДИКПРО. – Электрон. дан. – Режим доступа: <https://medicpro-kaluga.ru/services/endocrinology/sindrom-diabeticheskoy-stopy/> (дата обращения: 08.08.23).
3. The Protein Data Bank / H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng [et al] // Nucleic Acids Research. – 2000. – Vol. 28. – P. 235–242.
4. The PentUnFOLD algorithm as a tool to distinguish the dark and the light sides of the structural instability of proteins / V. V. Poboinev, V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva [et al] // Amino Acids. – 2022. – Vol. 54. – P. 1155–1171.
5. Аминокислотные замены M21R и K48R увеличивают сродство эпидермального фактора роста человека к его рецептору [Электронный ресурс] / В. В. Побойнев, В. А. Козел, А. Р. Козел // Физико-химическая биология как основа современной медицины : мат. докл. междунар. науч. конф., Минск, 28 октября 2022 г. / Белорус. гос. мед. ун-т ; редкол.: В. В. Хрусталёв [и др.]. – Минск, 2022. – С. 230–235.