

А. А. Акуневич

МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ФОРМЫ С АМИНОКИСЛОТНОЙ ЗАМЕНОЙ D46G С РЕЦЕПТОРАМИ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ

Научный руководитель: канд.биол. наук, доц. В. В. Хрусталёв

Кафедра общей химии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

A. A. Akunevich

MODELING OF THE HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR AND ITS FORM WITH D46G AMINO ACID SUBSTITUTION COMPLEXES WITH HUMAN AND MOUSE RECEPTORS

Tutor: PhD, associate professor V. V. Khrustalev

Department of General Chemistry,

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. В статье приводится анализ межмолекулярных взаимодействий в моделях комплексов нативного эпидермального фактора роста человека и его формы с аминокислотной заменой с рецепторами человека и мыши. В модели комплекса нативного пептида с рецептором мыши взаимодействия выражены сильнее, чем с рецептором человека. В то же время аминокислотная замена D46G в большей степени влияет на связь пептида с рецептором мыши, чем с рецептором человека.

Ключевые слова: эпидермальный фактор роста, докинг пептидов.

Resume. The article provides an analysis of intermolecular interactions in models of the native human epidermal growth factor and its form with amino acid substitution complexes with human and mouse receptors. These interactions are more pronounced in the model of the native peptide with the mouse receptor than with the human receptor complex. At the same time, the amino acid substitution D46G has a greater effect on the peptide binding to the mouse receptor than to the human receptor.

Keywords: epidermal growth factor, protein docking.

Актуальность. Для большинства агрессивных типов карцином характерна аномальная активность сигнального пути через рецептор эпидермального фактора роста человека (чРЭФР)[1]. Мутационные процессы, происходящие в опухолевых клетках, обуславливают неэффективность традиционной терапии[2]. По этой причине разработка лекарственных средств, направленных на данную мишень, всё ещё является актуальной задачей. Возможное решение данной проблемы — создание нового ингибитора на основе нативной структуры эпидермального фактора роста человека (чЭФР) с помощью направленной замены аминокислотных остатков в его структуре. Для лучшего понимания межмолекулярных взаимодействий лиганда и рецептора *in vivo*, одним из этапов разработки является моделирование комплексов пептида с чРЭФР и с рецептором мыши (мРЭФР) как модельного животного. Выполнение данной цели позволит провести доклинические исследования более эффективно.

Цель: прояснить молекулярные механизмы взаимодействия чЭФР с аминокислотной заменой D46G с рецепторами человека и мыши в сравнении с комплексами чЭФР-чРЭФР и мЭФР-мРЭФР.

Задачи:

1. Построить модели комплексов чЭФР-чРЭФР, мЭФР-мРЭФР, чЭФР-мРЭФР, чЭФР D46G-чРЭФР, чЭФР D46G-мРЭФР.

2. Определить межмолекулярные взаимодействия между лигандом и рецептором в смоделированных комплексах.

3. Провести сравнение полученных данных и выявить отличия, способные повлиять на взаимодействию нового ингибитора с рецепторами человека имыши.

Материал и методы. мРЭФР, мЭФР и чЭФР D46G были смоделированы на сервере Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) с использованием в качестве шаблона структур чРЭФР и чЭФР, соответственно (PDB ID 1IVO). Моделирование всех комплексов осуществлялось на сервере ClusPro 2.0 (<https://cluspro.org/>). Для тестирования алгоритма предварительно был проведён докинг чЭФР и чРЭФР (PDB ID 1IVO). Конформационная структура предсказанного комплекса соответствовала строению комплексов, размещённых в PDB (ID 1IVO, 1NQL, 3NJP). В качестве лиганда при моделировании комплексов чЭФР-чРЭФР и чЭФР-мРЭФР выступала структура чЭФР из PDB ID 1IVO. Для каждого комплекса было построено от 19 до 24 моделей. Для анализа были отобраны первые модели из каждой группы результатов докинга, что соответствовало известной структуре чЭФР-чРЭФР, полученной методом рентгеноструктурного анализа. Эти модели имели наибольший размер кластера, формируемого алгоритмом ClusPro в результате объединения тысячи структур с наименьшей энергией связывания. Иными словами, отобранные для анализа модели являются геометрически выгодными. Анализ межмолекулярных взаимодействий между лигандом и рецептором проводился с помощью серверов PIC (<http://pic.mbu.iisc.ernet.in/>) и Prodigy (<https://bianca.science.uu.nl/prodigy/>). Сравнение аминокислотных последовательностей чРЭФР (Uniprot ID P00533) и мРЭФР (Uniprot ID Q01279) и поиск аминокислотных замен осуществлялось в программе MEGA 10.

Результаты и их обсуждение. Полученные модели комплексов приведены на рисунке 1.

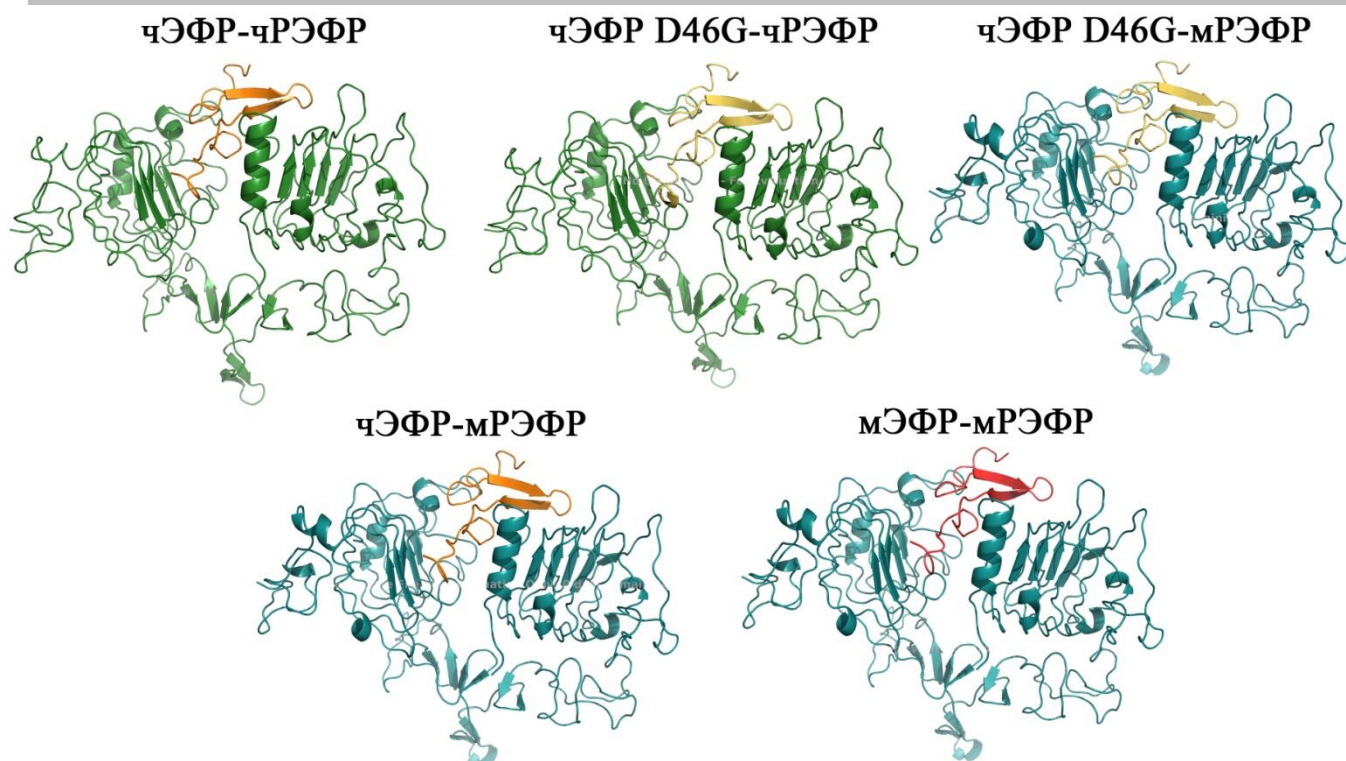


Рис. 1 – Строение комплексов, полученных в результате моделирования

Свободная энергия Гиббса межмолекулярного взаимодействия (ΔG) как интегральный показатель, характеризующий силу и характер межмолекулярных связей между лигандом и рецептором внутри смоделированных комплексов, приведена в таблице 1. Наибольшее количество межмолекулярных взаимодействий наблюдается в комплексе чЭФР-мРЭФР, наименьшее — в комплексе мЭФР-мРЭФР. В третьем домене рецептора всех полученных моделей наблюдается большее количество межмолекулярных контактов между лигандом и рецептором, чем в первом.

Табл. 1. Межмолекулярные взаимодействия внутри смоделированных комплексов

Показатель		чЭФР-чРЭФР	чЭФР D46G-чРЭФР	чЭФР D46G-мРЭФР	чЭФР-мРЭФР	мЭФР-мРЭФР
Расчётная ΔG , ккал/моль		-16,0	-17,2	-17,9	-17,2	-13,2
Межмолекулярные взаимодействия	Гидрофобные	17	21	22	21	14
	Водородные связи между главными цепями аминокислотных остатков	5	3	5	4	3
	Водородные связи между главными и боковыми цепями аминокислотных остатков	21	18	22	29	21
	Водородные связи между боковыми цепями аминокислотных остатков	16	16	20	27	16
	Ионные	4	3	3	6	2
	Ароматические	1	2	2	1	3
	Катион-пи	3	3	3	3	3
	Всего	67	66	77	91	62
	среди них:					
с первым доменом рецептора	26	28	23	44	21	
с третьим доменом рецептора	41	38	54	47	41	

В дальнейшем анализе взаимодействий обращалось внимание на следующее: 1) различие в их числе между комплексами чЭФР с рецепторами человека и мыши; 2) изменение их количества внутри комплексов с чРЭФР и мРЭФР после внесения аминокислотной замены D46G; 3) влияние аминокислотной замены на связывание С-конца пептида с рецептором.

Гидрофобные взаимодействия. Внесение аминокислотной замены повлияло на существующие взаимодействия в комплексе исследуемого пептида с мРЭФР в большей степени, чем в комплексе с чРЭФР. В комплексе с рецептором мыши происходит разрыв пяти гидрофобных взаимодействий в положениях Leu23, Leu26 и Ala30 лиганда, тогда как в комплексе с рецептором человека происходит разрыв только одного гидрофобного взаимодействия. В комплексе с чРЭФР образуются новые связи с третьим доменом рецептора в положении Tyr29 лиганда и с первым доменом рецептора в положениях Met21, Leu23, Leu26, Ala30 лиганда. В комплексе с мРЭФР также образуются новые связи с третьим доменом рецептора в положениях Leu15 и Tyr44 лиганда, а также с первым доменом рецептора в положении Leu26 лиганда. Внесение аминокислотной замены не повлияло на количество гидрофобных взаимодействий на С-конце пептида. При этом чЭФР и чЭФР D46G образует большее количество взаимодействий с мРЭФР, чем его «родной» лиганд мЭФР: семь и восемь дополнительных связей, соответственно.

Водородные связи между главными цепями аминокислотных остатков. Внесение аминокислотной замены вызывает потерю двух водородных связей в положении Asp11 с третьим доменом чРЭФР, однако эти связи сохраняются в комплексах пептида с мРЭФР.

Водородные связи между главными и боковыми цепями аминокислотных остатков. Внесение аминокислотной замены вызывает потерю водородных связей исследуемого пептида с третьим доменом чРЭФР в трёх положениях, в том числе образуемую остатком Trp50 С-конца пептида. Взаимодействие чЭФР с рецептором мыши выражено в большей степени, чем с рецептором человека: в комплексе с мРЭФР пептид образует восемь новых водородных связей как с первым, так и с третьим доменом рецептора. Внесение аминокислотной замены уменьшает количество взаимодействий пептида с первым доменом мРЭФР, в том числе на его С-конце (Lys48). В комплексе мЭФР-мРЭФР выражены взаимодействия С-конца пептида и третьего домена рецептора: мЭФР аминокислотный остаток Arg48 образует с рецептором семь водородных связей.

Водородные связи между боковыми цепями аминокислотных остатков. В составе комплексов с рецепторами мыши и человека остаток Asp46 чЭФР и мЭФР образует водородные связи с остатком Arg53, расположенном в первом домене рецептора. При внесении аминокислотной замены все четыре водородные связи в данном положении обоих рецепторов исчезают. Однако в чРЭФР образуются новые связи с третьим доменом рецептора в положении Tyr44 и с первым — в положении Lys28 пептида. В мРЭФР также исчезают четыре водородные связи в положении Glu40 пептида с первым доменом рецептора. Взаимодействие чЭФР с мРЭФР выражено в большей степени, чем с чРЭФР: в комплексе с рецептором мыши пептид образует одиннадцать новых водородных связей преимущественно за счёт взаимодействия с первым доменом рецептора. В комплексе мЭФР-мРЭФР выражено взаимодействие

С-конца пептида с рецептором: остатки Asp46 и Arg48 образуют по три водородные связи с первым и третьим доменом рецептора, соответственно.

Ионные взаимодействия. При внесении аминокислотной замены исчезают взаимодействия в 46-ом положении пептида с обоими доменами чРЭФР и мРЭФР. В комплексе мЭФР-мРЭФР в данном положении образуется связь между остатком Asp46 пептида и первым доменом рецептора. Взаимодействие чЭФР с рецептором мыши выражено в большей степени, чем с рецептором человека за счёт дополнительных двухионных связей.

Ароматические взаимодействия. Внесение аминокислотной замены вызывает образование дополнительного взаимодействия с третьим доменом обоих рецепторов в положении Tyr29 пептида.

Катион-пи. Внесение аминокислотной замены не влияет на катион-пи взаимодействия внутри рассмотренных комплексов.

Таким образом, при внесении аминокислотной замены D46G наблюдаются отличия в характере связывания пептида с рецепторами человека и мыши. Эти отличия заключаются в характере формируемых гидрофобных взаимодействий и водородных связей. Причиной того может служить аминокислотный состав внеклеточных доменов чРЭФР и мРЭФР. Они отличаются на 71 аминокислотный остаток, из них 24 замены расположены в первом домене и 21 замена — во втором. Непосредственно в аминокислотной последовательности пептид-связывающих центров наблюдаются 12 замен (таблица 2).

Табл. 2. Различия в аминокислотном составе пептид-связывающих центров чРЭФР и мРЭФР

Позиция	чРЭФР	мРЭФР	Позиция	чРЭФР	мРЭФР
Первый домен			Третий домен		
37	Lys	Arg	348	Ser	Thr
55	Phe	Tyr	377	Arg	Lys
111	Met	Ala	383	His	Arg
112	Tyr	Leu	442	Ser	Gly
116	Ser	Thr	491	Ile	Met
121	Val	Ile	492	Ser	Asn

При внесении аминокислотной замены общая энергия связи пептида с обоими доменами чРЭФР и мРЭФР повышается, однако это повышение в разной степени затрагивает взаимодействие пептида с каждым из доменов. В комплексе пептида с мРЭФР после внесения аминокислотной замены отмечено относительное снижение аффинности пептида к первому домену (при этом расчётная ΔG изменяется от -11,8 ккал/моль до -12,0 ккал/моль) и повышение аффинности к третьему домену (при этом расчётная ΔG изменяется от -11,6 ккал/моль до -12,1 ккал/моль). Для комплекса пептида с чРЭФР характерна обратная зависимость: после внесения аминокислотной замены пептид демонстрирует повышенную аффинность к первому домену (при этом расчётная ΔG изменяется от -10,6 ккал/моль до -12,1 ккал/моль), и пониженную — к третьему (при этом расчётная ΔG изменяется от -10,9 ккал/моль до -10,8 ккал/моль).

Выводы:

1 В модели комплекса чЭФР-мРЭФР предсказывается большее количество межмолекулярных взаимодействий в сравнении с моделью комплекса чЭФР-чРЭФР. Это происходит за счёт формирования большего количества гидрофобных и ионных взаимодействий, а также образования дополнительных водородных связей.

2 Испытания чЭФРс аминокислотной заменой D46G следует проводить на линиях опухолевых клеток человека. Основанием для этого служат результаты проведённого белок-белкового докинга: повторение эксперимента на линиях опухолевых клеток мышей может показать результаты, значительно отличающиеся от тех, что получены на линиях опухолевых клеток человека.

Литература

1. Sigismund, S. Emerging functions of the EGFR in cancer / S. Sigismund, D. Avanzato, L. Lanzetti // Molecular Oncology. – 2018. – № 12. – P. 3-20.

2. Known and putative mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies in NSCLC patients with EGFR mutations / E. L. Stewart, S. Z. Tan, G. Liu et al. // Translational Lung Cancer Research. – 2015. – № 4. – P. 67-81.

РЕПОЗИТОРИЙ БГМУ