

Д.Л. Колесник

**ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН НА МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МУТАНТНЫХ ФОРМ ЭПИГЕНА И
ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА АЛЬФА С РЕЦЕПТОРОМ
ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА**

Научный руководитель: ассист. А.А. Акуневич

Кафедра общей химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

D.L. Kolesnik

**EFFECT OF AMINO ACID SUBSTITUTIONS ON THE INTERMOLECULAR
INTERACTIONS OF MUTANT EPIGEN AND TRANSFORMING GROWTH
FACTOR ALPHA WITH EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR**

Tutor: assistant A.A. Akunevich

Department of General Chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. В статье проанализированы аминокислотные замены, возникающие в структуре эпигена и трансформирующего фактора роста альфа при онкогенезе. Показано, что замены в области минорной бета-шпильки EGF-подобного домена увеличивают сродство мутантных форм лигандов к рецептору: в активной форме эпигена – замены T46N и R41W, в активной форме трансформирующего фактора роста альфа – замена G37W.

Ключевые слова: трансформирующий фактор роста альфа; эпиген; аминокислотные замены; онкогенез.

Resume. Amino acid substitutions that occur in epigen and transforming growth factor alpha structure during oncogenesis are analyzed in the article. It was shown that substitutions in the region of the minor beta-hairpin of the EGF-like domain increase the affinity of mutant ligands for the receptor: in the epigen active form – T46N and R41W substitutions; in the transforming growth factor alpha active form – G37W substitution.

Keywords: transforming growth factor alpha; epigen; amino acid substitutions; oncogenesis.

Актуальность. Эпиген и TGF- α (от англ. transforming growth factor alpha – трансформирующий фактор роста альфа) являются пептидами семейства EGF-подобных факторов роста (от англ. epidermal growth factor – эпидермальный фактор роста), стимулирующих деление и дифференцировку эпителиальных клеток. Данные лиганды синтезируются в виде интегральных мембранных пробелков, активные формы которых высвобождаются с клеточной поверхности посредством регулируемого протеолиза [2]. Связывание EGFR (от англ. epidermal growth factor receptor – рецептор эпидермального фактора роста) с эпигеном или TGF- α вызывает активацию данного трансмембранного рецептора, его автофосфорилирование и димеризацию, что в свою очередь индуцирует активацию внутриклеточных сигнальных каскадов, рост опухоли и метастазирование [1]. Выявление мутаций в структуре эпигена и TGF- α , которые могут влиять на стабильность их вторичной структуры, взаимодействие с рецептором и активность, позволит прояснить молекулярные механизмы опухолевой прогрессии.

Цель: описать влияние аминокислотных замен, наблюдаемых в опухолевых клетках, на стабильность EGF-подобного домена эпигена и TGF- α и межмолекулярные взаимодействия их мутантных форм с рецептором EGFR.

Задачи:

1. Определить влияние миссенс-мутаций, возникающих в активной форме эпигена и TGF- α при онкогенезе, на стабильность элементов их вторичной структуры.
2. Смоделировать мутантные формы эпигена и TGF- α , а также их комплексы с рецептором EGFR.
3. Проанализировать взаимодействия, возникающие в смоделированных комплексах мутантной формы эпигена и TGF- α с рецептором EGFR.

Материалы и методы. Для анализа использовались аминокислотные последовательности активной формы эпигена и TGF- α . Данные о мутациях данных пептидов в опухолевых клетках были получены из базы данных COSMIC (Wellcome Sanger Institute, Великобритания). Влияние миссенс-мутаций на стабильность элементов вторичной структуры активной формы эпигена и TGF- α оценивали с помощью оригинального компьютерного алгоритма PentUnFOLD 2D (<http://pent-unfold.bsmu.by>) [7]. Для анализа с помощью алгоритма использовали структуры пептидов из базы данных Protein Data Bank: PDB ID 5wb8 (эпиген), 1mox (TGF- α). Для моделирования структур мутантных форм использовался сервер SWISS-MODEL [5]. Для докинга смоделированных лигандов с рецептором EGFR использовался сервер ClusPro [6]. Для анализа типа и количества взаимодействий, возникающих в смоделированных комплексах «лиганд-рецептор», использовался сервер PIC [8]. Для предсказания величины константы диссоциации комплекса и энергии связывания «лиганд-рецептор» использовался сервер Prodigy [3].

Результаты и их обсуждение. Ряд аминокислотных замен дестабилизирует EGF-подобный домен эпигена: замены I16T и E25G приводят к повышению вероятности перехода остатков G18 и K28 в неупорядоченную структуру на концах бета-цепей главной бета-шпильки, а замены G39R и T46N понижают стабильность его минорной бета-шпильки. Замены G39R и T46N также повышают вероятность перехода остатков Y37, T38 и L45 из стабильной бета-цепи в нестабильную (склонную к переходу в неупорядоченное состояние). Замена G36C, напротив, повышает вероятность перехода остатка Y37 минорной бета-шпильки из нестабильной бета-цепи в стабильную. Замена R41W повышает вероятность перехода неупорядоченной структуры петли, расположенной между бета-цепями минорной бета-шпильки EGF-подобного домена, в бета-цепь, что может привести к удлинению минорной бета-шпильки EGF-подобного домена и его структурной реорганизации. Другие аминокислотные замены (R32K, R41K, T48I) в активной форме эпигена не влияют на стабильность элементов его вторичной структуры.

Тем не менее, как видно из таблицы 1, большая часть замен, происходящих в структуре активной формы эпигена при канцерогенезе, не влияет на сродство мутантной формы к рецептору и не приводит к выраженному изменению величины свободной энергии Гиббса и константы диссоциации комплекса. Наиболее выраженным влиянием на сродство мутантной формы эпигена к рецептору обладают замены, расположенные в минорной бета-шпильке EGF-подобного домена. Среди замен, которые снижают стабильность элементов его вторичной структуры, только

замена T46N приводит к снижению константы диссоциации комплекса, и следовательно, к увеличению сродства мутантных форм к рецептору EGFR. Причиной тому является тип и количество формируемых взаимодействий в структуре моделей комплексов. Как видно из таблицы 1, замена T46N приводит к увеличению сродства лиганда к рецептору за счёт формирования дополнительных водородных связей, тогда как замена R41W приводит к увеличению сродства лиганда к рецептору преимущественно за счёт формирования дополнительных сайтов для гидрофобного взаимодействия. Замена G39R, напротив, снижает сродство лиганда к рецептору EGFR за счёт снижения количества гидрофобных взаимодействий.

Табл. 1. Тип и количество межмолекулярных взаимодействий в моделях комплексов мутантных форм эпигена и EGFR

АК замена	Водородные связи			Другие взаимодействия				ΔG (ккал· моль ⁻¹)	K_d (M) при 37 °C
	Главная цепь– главная цепь	Главная цепь– боковая цепь	Боковая цепь– боковая цепь	Гидрофобные	Ионные	Ароматические	Катион-пи		
Нативный комплекс	1	10	19	14	4	1	3	-14,1	$1,2 \cdot 10^{-10}$
R32K	1	19	27	14	4	1	3	-14,1	$1,2 \cdot 10^{-10}$
R41K	2	11	14	12	3	0	3	-14,2	$9,4 \cdot 10^{-11}$
T48I	4	17	19	10	2	1	3	-14,0	$1,4 \cdot 10^{-10}$
I16M	4	10	13	11	3	1	3	-14,3	$8,9 \cdot 10^{-11}$
E25G	1	11	21	13	4	1	3	-14,0	$1,4 \cdot 10^{-10}$
G39R	4	13	24	7	4	1	3	-12,7	$1,2 \cdot 10^{-9}$
T46N	1	12	23	13	4	1	3	-14,6	$5,4 \cdot 10^{-11}$
G36C	4	12	15	10	3	1	3	-14,3	$8,3 \cdot 10^{-11}$
R41W	0	8	16	15	4	0	2	-15,9	$5,7 \cdot 10^{-12}$

Аминокислотные замены D10N и S11F в N-концевом фрагменте TGF- α уменьшают вероятность перехода остатка H12 в неупорядоченное состояние. Замена A31S повышает вероятность перехода 31-го остатка главной бета-шпильки из стабильной бета-цепи в нестабильную бета-цепь и уменьшает вероятность перехода остатка K29 в неупорядоченное состояние. G37W повышает вероятность перехода остатка Y38 минорной бета-шпильки из нестабильной бета-цепи в стабильную бета-цепь. Замена G40D повышает вероятность перехода остатков Y38 и V39 минорной бета-шпильки в неупорядоченное состояние. Аминокислотные замены E44K и A50V не влияют на стабильность элементов вторичной структуры.

Согласно результатам моделирования, аминокислотная замена G37W, стабилизирующая минорную бета-шпильку, является единственной заменой, которая увеличивает сродство TGF- α к EGFR. Как видно из таблицы 2, это объясняется выраженным увеличением количества водородных взаимодействий на 26 связей. Другие проанализированные аминокислотные замены, среди которых стабилизирующие N-концевой фрагмент и главную бета-шпильку, а также дестабилизирующие минорную бета-шпильку, приводят к увеличению константы диссоциации комплекса, и следовательно, к снижению сродства данных мутантных форм TGF- α к рецептору EGFR. В большей степени это может объясняться снижением количества гидрофобных взаимодействий в структуре комплексов «мутантная форма TGF- α -EGFR»: например, в комплексе с заменой A31S в структуре TGF- α их количество снижается на 6 связей, A50V и D10N – на 5 связей, E44K и G40D – на 4 связи, S11F – на 3 связи.

Табл. 2. Тип и количество межмолекулярных взаимодействий в моделях комплексов мутантных форм TGF- α и EGFR

АК замена	Водородные связи			Другие взаимодействия				ΔG (ккал· моль ⁻¹)	K_d (M) при 37 °C
	Главная цепь– главная цепь	Главная цепь– боковая цепь	Боковая цепь– боковая цепь	Гидрофобные	Ионные	Ароматические	Катион-пи		
Нативный комплекс	3	11	28	17	3	2	2	-17,3	$6,7 \cdot 10^{-13}$
A31S	3	16	40	11	5	2	2	-16,3	$3,4 \cdot 10^{-12}$
A50V	3	14	29	12	2	2	2	-16,9	$1,3 \cdot 10^{-12}$
D10N	3	15	28	12	4	1	2	-15,8	$7,6 \cdot 10^{-12}$
E44K	2	12	35	13	3	2	1	-14,9	$3,3 \cdot 10^{-11}$
G37W	2	20	46	13	4	1	0	-17,7	$3,1 \cdot 10^{-13}$
G40D	4	22	31	13	2	1	2	-15,6	$9,8 \cdot 10^{-12}$
S11F	3	18	24	14	2	3	2	-16,9	$1,3 \cdot 10^{-12}$

Таким образом, аминокислотные замены в EGF-подобном домене активных форм эпигена и TGF- α оказывают наибольшее влияние на стабильность элементов его вторичной структуры. Большая часть рассмотренных аминокислотных замен, наблюдаемых в опухолевых клетках, приводит к снижению стабильности элементов вторичной структуры эпигена, что часто наблюдается в структуре митогенов при злокачественном перерождении клеток [4]. Замены I16T, E25G, G39R и T46N дестабилизируют, тогда как замена G36C, напротив, стабилизирует EGF-подобный домен эпигена. Однако только одна аминокислотная замена G40D в структуре

активной формы TGF- α дестабилизирует EGF-подобный домен, тогда как замены A31S и G37W стабилизируют его.

Исходя из результатов моделирования, наибольшим влиянием на сродство мутантных форм эпигена и TGF- α к рецептору обладают замены в области минорной бета-шпильки EGF-подобного домена. Поскольку данный структурный фрагмент вовлечён в образование поверхности межмолекулярного контакта в структуре димерной формы EGF, аминокислотные замены в данной области могут выражено влиять на биологическую активность мутантных форм рассмотренных лигандов посредством изменения равновесия их димерных и мономерных форм в физиологических условиях, что необходимо доказать в дальнейших *in vitro* и *in vivo* исследованиях.

Выводы:

1. Мутации с.296C/A и с.280A/T в кодирующей последовательности эпигена, приводящие к аминокислотным заменам T46N и R41W в активной форме данного лиганда, могут иметь клиническую значимость, поскольку они приводят к дестабилизации и реорганизации минорной бета-шпильки EGF-подобного домена и увеличению сродства мутантной формы эпигена к рецептору.

2. Мутация с.226G/T в кодирующей последовательности TGF- α , приводящая к аминокислотной замене G37W в активной форме данного лиганда, также может иметь клиническую значимость, поскольку она приводит к увеличению сродства мутантной формы TGF- α к рецептору, несмотря на повышение стабильности минорной бета-шпильки EGF-подобного домена.

3. Выявление описанных мутаций посредством секвенирования генома опухолевых клеток, может иметь прогностическое значение, поскольку данные замены могут привести к увеличению биологической активности эпигена и TGF- α и стимулировать опухолевую прогрессию.

Литература

1. Daniel, M. EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling / M. Daniel // Cell. – 2017. – Vol. 171(3). – P. 683–695.
2. Dong, J. Trafficking and Proteolytic Release of Epidermal Growth Factor Receptor Ligands Are Modulated by Their Membrane-anchoring Domains / J. Dong, H. S. Wiley // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Vol. 275(1). – P. 557–564.
3. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes / L. C. Xue, J. P. Rodrigues, P. L. Kastiris et al. // Bioinformatics. – 2016. – № 32. – P. 3676–3678.
4. Proteome Instability Is a Therapeutic Vulnerability in Mismatch Repair-Deficient Cancer / D. J. McGrail, J. Garnett, J. Yin et al. // Cancer Cell. – 2020. – Vol. 37(3). – P. 371–386.
5. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes / A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert et al. // Nucleic Acids Research. – 2018. – Vol. 46. – P. 296–303.
6. The ClusPro web server for protein–protein docking / D. Kozakov, D. R. Hall, B. Xia et al. // Nature Protocols. – 2017. – Vol. 12. – P. 255–278.
7. 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(8). – P. 1155–1171.
8. Tina, K. G. PIC: Protein Interactions Calculator / K. G. Tina, R. Bhadra, N. Srinivasan // Nucleic Acids Research. – 2007. – Vol. 35. – P. 473–476.