

В.А. Козел

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН M21R, M21K, K48R
НА ХАРАКТЕР ВНУТРИ И МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА**

Научный руководитель: ассист., магистр мед. наук В.В. Побойнев

Кафедра общей химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

V.A. Kozel

**EVALUATION OF THE EFFECT OF AMINO ACID SUBSTITUTIONS M21R,
M21K, K48R ON THE CHARACTER OF INTRA AND INTERMOLECULAR
INTERACTIONS IN HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR**

Tutor: PhD, assistant professor V.V. Poboinev

Department of General Chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. В данной статье было проанализировано влияние аминокислотных замен M21R, M21K, K48R на стабильность вторичной структуры эпидермального фактора роста человека и на способность эпидермального фактора роста человека к формированию неструктурированных фрагментов, оценено влияние данных аминокислотных замен на химические связи как внутри самого белка, так и между белком и его рецептором.

Ключевые слова: синдром диабетической стопы, аминокислотные замены, биоинформатика.

Resume. In this article the effect of amino acid substitutions M21R, M21K, K48R on the stability of the secondary structure of human epidermal growth factor and on the ability of human epidermal growth factor to form unstructured protein fragments was analyzed, the effect of these amino acid substitutions on chemical bonds both within the protein itself and between the protein and its receptor was evaluated.

Keywords: diabetic foot syndrome, amino acid substitutions, bioinformatics.

Актуальность. Сахарный диабет (СД) – это глобальная проблема всего мира. Согласно данным Международной диабетической федерации на 2022 год насчитывается более 463 млн. выявленных пациентов с сахарным диабетом, что составляет более 7,5% от всего населения планеты. Статистика заболеваемости диабетом ежегодно растёт. Если ситуация будет развиваться теми же темпами, то к 2025 году количество пациентов с диабетом увеличится в 2 раза. К 2030 году сахарный диабет станет 7-й причиной смерти во всём мире. Актуальна данная проблема и для нашей страны. За 20 лет в Беларуси в 3 раза выросло количество больных с сахарным диабетом. По состоянию на начало 2022 года на учёте находилось почти 360,5 тысяч человек, из них (по данным Министерства здравоохранения РБ): 18542 пациента с СД 1 типа, 338 тыс. пациенты с СД 2 типа; кроме того, зафиксировано 434 случая гестационного диабета и 2648 случаев других специфических типов диабета. Сахарный диабет представляет собой реальную угрозу за счет ранней инвалидизации и высокой смертности от сосудистых катастроф. Диабет – единственное неинфекционное заболевание, взятое под контроль Организацией Объединённых Наций.

Диабетическая стопа – одно из серьёзных осложнений, возникающих у пациентов, страдающих сахарным диабетом. Очаг инфекционного поражения, язвенный дефект и деструкция глубоких тканей стоп обусловлены неврологическими нарушениями и снижением магистрального кровотока в артериях нижних конечностей различной степени тяжести. У пациентов с диабетом снижается концентрация эпидермального фактора роста. Дефицит фактора роста ухудшает заживление ран, что приводит к хроническим незаживающим язвам. Диабетическая язва стопы наиболее трудно поддается лечению и сопряжена с наибольшим риском ампутации. Увеличение количества пациентов с дефектами кожных покровов и мягких тканей нижних конечностей на прямую связано с увеличением количества пациентов с СД.

Неберprot-P – уникальное лекарство, разработанное на Кубе. Оно применяется для устранения проявлений сахарного диабета, в том числе язв нейропатического или ишемического типа. Ключевым компонентом Неберprot-P является пептид высокого уровня очистки человеческого рекомбинантного эпидермального фактора роста, это вещество, попадая в поврежденную зону, способствует максимально быстрой регенерации тканей. Препарат разрабатывали очень долго, для этого потребовалось больше двадцати лет. Неберprot-P на данный момент является единственным специализированным препаратом, применяемым для лечения синдрома диабетической стопы. Но процент ампутаций, все же довольно высок, составляет 9-11%. Так же, остаются вопросы по экономической составляющей, времени лечения.

Цель: оценка влияния аминокислотных замен M21R, M21K, K48R на способность эпидермального фактора роста человека (ЭФРЧ) к структурным переходам и изменение химических связей внутри самого ЭФРЧ, а также между ЭФРЧ и его рецептором.

Задачи:

1. Определить влияние аминокислотных замен на способность M21R, M21K, K48R ЭФРЧ к структурным переходам.
2. Определить изменения химических связей внутри самого ЭФРЧ и комплексе ЭФРЧ-рецептор при внесении данных аминокислотных замен.
3. Проанализировать полученные результаты и сделать на их основе заключение о возможности использования данных аминокислотных замен в дальнейших экспериментах *in vitro*.

Материалы и методы. Объектом исследования в данной работе является аминокислотная последовательность ЭФРЧ, которая была взята из PDB (PDB ID: 1IVO: C) [1]. Влияние аминокислотных замен на стабильность вторичной структуры определяли с помощью алгоритма PentUnFOLD [2], алгоритм предназначен для поиска структур в аминокислотной последовательности белков с нестабильной конформацией, результаты представлены в виде файлов Excel со встроенным алгоритмом расчета. Изменение аффинности мутантного эпидермального фактора роста к его рецептору оценивали на основании $\Delta\Delta G$ с помощью программы mCsM-PP12 [3]. Значение $\Delta\Delta G$ должно быть положительным, так как данный параметр находится как разность ΔG нативного белка и ΔG эпидермального фактора роста с аминокислотной заменой. С помощью алгоритма Protein Interactions Calculator (PIC)

[4] оценивали влияние аминокислотных замен на изменение химических взаимодействий между цепями ЭФРЧ и между ЭФРЧ и рецептором. PIS распознает различные виды взаимодействий, такие как дисульфидные связи, гидрофобные взаимодействия, ионные взаимодействия, водородные связи, ароматические взаимодействия, взаимодействия ароматической серы и катион-π взаимодействия внутри белка или между белками в комплексе. Он также определяет доступную площадь поверхности, а также расстояние остатка от поверхности белка. Взаимодействия рассчитываются на основе эмпирического или полуэмпирического набора правил.

Результаты и их обсуждение. На предыдущем этапе работы с помощью программы PentUnFOLD нами было выявлено 29 аминокислотных замен, повышающих внутреннюю нестабильность ЭФРЧ. Среди данных аминокислотных замен мы выбрали три: M21R, M21K, K48R, так как они также повышают аффинность эпидермального фактора роста к рецептору (на основании алгоритма mCsM-PPI2).

Аминокислотная замена M21R повышает способность ЭФРЧ к структурному переходу в полностью неструктурированное состояние за счёт исчезновения двух гидрофобных взаимодействий и нескольких водородных связей внутри самого белка (таблица 1), увеличивая при этом сродство к рецептору ($\Delta\Delta G = 0,616$ ккал/моль) благодаря формированию трёх новых водородных связей (таблица 2).

Табл. 1. Изменение количества связей внутри ЭФРЧ с аминокислотной заменой M21R

Химические связи внутри ЭФРЧ		
	Без замены	С заменой
Гидрофобные взаимодействия	13	11
Водородные связи между главной и боковой цепью	24	22
Водородные связи внутри боковой цепи	3	2

Табл. 2. Изменение количества связей между рецептором и ЭФРЧ с аминокислотной заменой M21R

Химические связи между ЭФРЧ и рецептором		
	Без замены	С заменой
Водородные связи между главной и боковой цепью	17	19
Водородные связи между боковыми цепями	16	17

Аминокислотная замена M21K также увеличивает способность ЭФРЧ к структурному переходу в полностью неструктурированное состояние за счёт исчезновения двух гидрофобных взаимодействий и четырёх водородных связей внутри самого белка (таблица 3), но незначительно увеличивает аффинность ($\Delta\Delta G =$

0,115 ккал/моль) за счёт появления двух новых водородных взаимодействий в комплексе лиганд-рецептор (таблица 4).

Табл. 3. Изменение количества связей внутри ЭФРЧ с аминокислотной заменой M21K

Химические связи внутри ЭФРЧ		
	Без замены	С заменой
Гидрофобные взаимодействия	13	11
Водородные связи внутри главной цепи	34	33
Водородные связи между главной и боковой цепью	24	23
Водородные связи между боковыми цепями	3	2

Табл. 4. Изменение количества связей между рецептором и ЭФРЧ с аминокислотной заменой M21K

Химические связи между ЭФРЧ и рецептором		
	Без замены	С заменой
Водородные связи между главной и боковой цепью	17	19
Водородные связи между боковыми цепями	16	17

Аминокислотная замена K48R повышает способность ЭФРЧ к структурным переходам за счёт исчезновения одной водородной связи внутри самого белка (таблица 5), значительно увеличивая при этом его аффинность к рецептору ($\Delta\Delta G = 1,528$ ккал/моль) за счёт появления тринадцати новых водородных связей в комплексе лиганд-рецептор. Также данная замена приводит к появлению катион-π взаимодействия между Arg48 ЭФРЧ и Phe412 рецептора (таблица 6).

Табл. 5. Изменение количества связей внутри ЭФРЧ с аминокислотной заменой K48R

Химические связи внутри ЭФРЧ		
	Без замены	С заменой
Водородные связи между главной и боковой цепью	24	23

Табл. 6. Изменение количества связей между рецептором и ЭФРЧ с аминокислотной заменой K48R

Химические связи между ЭФРЧ и рецептором		
	Без замены	С заменой
Водородные связи между главной и боковой цепью	17	29
Водородные связи между боковыми цепями	16	17
Катион-π взаимодействия	3	4

Выводы:

1. В результате проведенных *in silico* экспериментов определена роль аминокислотных замен (M21R, M21K, K48R) на способность эпидермального фактора роста человека к структурным переходам и изменение химических связей внутри самого ЭФРЧ.

2. Установлено, что в результате аминокислотных замен M21R, M21K, K48R происходит уменьшение количества химических взаимодействий внутри эпидермального фактора роста, но увеличивается количество взаимодействий между аминокислотными остатками эпидермального фактора роста и его рецептора.

Литература

1. Berman, H. M. The Protein Data Bank / H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – Vol. 28. – P. 235–242.
2. Poboinev, V. V. 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.
3. mCSM-PPI2: predicting the effects of mutations on protein–protein interactions / H. M. C. Rodrigues [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Vol. 47. – P. 338–344.
4. Tina, K. G. PIC: Protein Interactions Calculator / K. G. Tina, R. Bhadra, N. Srinivasan // *Nucleic Acids Research*. – 2007. – Vol. 35. – Web Server issue. – P. 473–476.