

*Д.Д. Смугага, Т.А. Шушко*  
**ОБ УЧАСТИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОПЕПТИДОВ В СВЯЗЫВАНИИ  
ФНО- $\alpha$  ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА**

*Научные руководители: канд. мед. наук, доц. С.Н. Чепелев,  
канд. биол. наук, доц. Т.В. Рябцева  
Кафедра патологической физиологии  
Кафедра биологической химии  
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

*D.D. Smuraga, T.A. Shushko*  
**ON THE PARTICIPATION OF SYNTHETIC OLIGOPEPTIDES IN TNF- $\alpha$   
BINDING TO REDUCE THE INFLAMMATORY PROCESS**

*Tutors: PhD, associate professor S.N. Chepelev,  
PhD, associate professor T.V. Ryabtseva  
Department of Pathological Physiology  
Department of Biological Chemistry  
Belarusian State Medical University, Minsk*

**Резюме.** Целью исследования явилось выяснение участия синтетических олигопептидов в связывании ФНО- $\alpha$  для снижения воспалительного процесса. Установлено, что тетрапептид Trp-Asn-Trp-Val, являющийся структурным аналогом цитокинсвязывающей области TNFRSF1B, среди всех исследуемых олигопептидов имеет максимальное по модулю значение свободной энергии связывания с ФНО- $\alpha$  |7,2 (7,1; 7,5)| ккал/моль.

**Ключевые слова:** ФНО- $\alpha$ , воспаление, синтетические олигопептиды, цитокиновый шторм.

**Resume.** The aim of the study was to determine the involvement of synthetic oligopeptides in binding TNF- $\alpha$  to reduce the inflammatory process. It was found that the tetrapeptide Trp-Asn-Trp-Val, which is a structural analogue of the cytokine-binding region of TNFRSF1B, among all the oligopeptides studied has the maximum absolute value of free energy of binding to TNF- $\alpha$  |7,2 (7,1; 7,5)| kcal/mol.

**Keywords:** TNF- $\alpha$ , inflammation, synthetic oligopeptides, cytokine storm.

**Актуальность.** Надсемейство фактора некроза опухоли (ФНО) включает 19 лигандов и 29 рецепторов и играет в организме разнообразную роль [2–4]. ФНО- $\alpha$  человека транслируется как белок массой 26 кДа, в котором отсутствует классический сигнальный пептид. Для биологической активности требуется тримеризация ФНО- $\alpha$ . Передача сигналов происходит за счет распознавания тримеров ФНО- $\alpha$  эндогенными рецепторами ФНО (TNFR) 1 и 2, которые образуют тримеры для образования комплекса с ФНО- $\alpha$  [1, 5].

Большинство членов суперсемейства обладают как полезными, так и опасными для организма эффектами [4]. ФНО- $\alpha$  относится к провоспалительным цитокинам и участвует в развитии цитокинового шторма. Поступление экзотоксинов в организм является причиной высвобождения большого количества провоспалительных цитокинов. Высвободившиеся в избыточном количестве цитокины провоцируют увеличение С-реактивного белка в гепатоцитах. Затем начинается эндотелиальное повреждение и активация коагуляции. Повреждение эндотелия на различных уровнях вызывает системную дисфункцию кровообращения, характеризующуюся сужением

сосудов, с последующей ишемией пораженных органов и нарушением микроциркуляции. В результате ишемии происходит повреждение органов и тканей, что приводит к еще большему выбросу эндотоксинов и повышению цитокинов в крови [3, 5].

Таким образом, существует необходимость в разработке методов для снижения концентрации цитокинов при их чрезмерной продукции. В настоящее время для использования в клинике одобрено пять ингибиторов, которые представляют собой препараты на основе моноклональных антител: инфликсимаб, адалимумаб и голимумаб, цертолизумаб пегол и этанерцепт. Однако антагонисты ФНО- $\alpha$  имеют ряд недостатков, таких как повышение риска микобактериальных и других внутриклеточных микробных инфекций; повышение риска развития злокачественных новообразований; анергия и риск развития хронических воспалительных заболеваний [1].

**Цель:** проанализировать энергию связывания ФНО- $\alpha$  с олигопептидами, являющимися аналогами цитокиносвязывающего домена рецептора TNFRSF1B *in silico*.

**Задачи:**

1. Определить фрагмент полипептидной цепи рецептора TNFRSF1B, участвующий в связывании TNF- $\alpha$ ;
2. Сконструировать олигопептиды, которые будут являться аналогом цитокиносвязывающего домена рецептора TNFRSF1B;
3. Проанализировать свободную энергию связывания олигопептидов с TNF- $\alpha$  и определить пептид с наилучшей энергией связывания.

**Материалы и методы.** Визуализацию молекулярных комплексов, работу с pdb-файлами и оценку свободной энергии связывания олигопептидов с цитокинами проводили с помощью программного обеспечения Chimera 1.14 с утилитой AutoDockVina. Для молекулярного докинга использовали pdb-файл 3ALQ.

Результаты исследования обрабатывали непараметрическими методами статистики с использованием пакетов статистического анализа данных Statistica10.0. Для представления результатов рассчитывали медиану (Me) и интерквартильный размах (25%; 75%).

**Результаты и их обсуждение.** На основании анализа трехмерной модели комплекса ФНО- $\alpha$  с рецептором TNFRSF1B выделили участок аминокислотной последовательности, обеспечивающий наиболее тесный контакт между цитокином и рецептором. Выделенная аминокислотная последовательность была разделена на олигопептиды, потенциально способные к взаимодействию с ФНО- $\alpha$ . Для ФНО- $\alpha$  сконструировали и исследовали *in silico* 54 олигопептида (15 ди-, 14 три-, 13 тетра- и 12 пентапептидов).

Для определения оптимальной длины олигопептида использовалось сравнение результатов измерения свободной энергии связывания ФНО- $\alpha$  с ди- и трипептидами, три- и тетрапептидами, тетра- и пентапептидами (метод Манна – Уитни). Свободная энергия связывания, или энергия Гиббса – это та часть всей энергии системы, которую можно использовать для совершения максимальной работы. Чем больше модуль

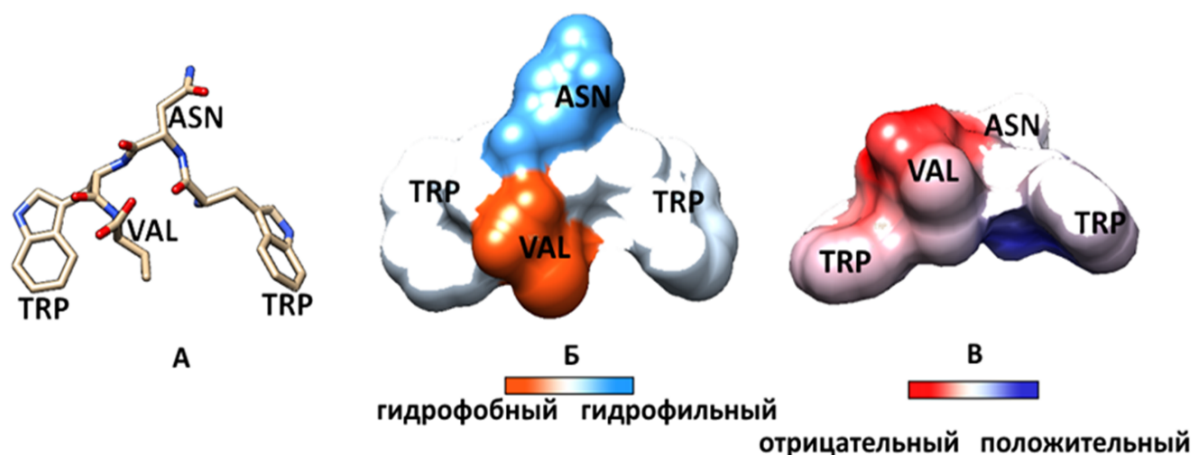
свободной энергии связывания, тем более стабильный комплекс образуется при связывании молекулы с лигандом.

Олигопептидами с минимальным модулем свободной энергии связывания являются дипептид Cys-Gly 4,25 (4,07;4,30); трипептид Glu-Cys-Leu 5,00 (4,92;5,10); тетрапептид Cys-Leu-Ser-Cys 5,10 (4,77;5,42); пентапептид Cys-Leu-Ser-Cys-Gly 5,30 (5,10;5,45). Олигопептидами с максимальным модулем свободной энергии связывания являются дипептид Trp-Asn 7,40 (6,95;7,80); трипептид Trp-Val-Pro 7,30(7,10;8,20); тетрапептид Trp-Asn-Trp-Val 7,20 (7,10;7,50); пентапептид Leu-Trp-Asn-Trp-Val 7,45 (6,75;7,50) (табл.1).

**Табл. 1.** Значения минимальной и максимальной свободной энергии связывания ди-, три-, тетра-, пентапептидов с тримерной формой TNF- $\alpha$

	Олигопептиды с минимальным модулем свободной энергии связывания, ккал/моль	Олигопептиды с максимальным модулем свободной энергии связывания, ккал/моль
Дипептид	Cys-Gly 4,25 (4,07;4,30)	Trp-Asn 7,40 (6,95;7,80)
Трипептид	Glu-Cys-Leu 5,00 (4,92;5,10)	Trp-Val-Pro 7,30 (7,10;8,20)
Тетрапептид	Cys-Leu-Ser-Cys 5,10 (4,77;5,42)	Trp-Asn-Trp-Val 7,20 (7,10;7,50)
Пентапептид	Cys-Leu-Ser-Cys-Gly 5,30 (5,10;5,45)	Leu-Trp-Asn-Trp-Val 7,45 (6,75;7,50)

Тетрапептид Trp-Asn-Trp-Val является структурным аналогом цитокинсвязывающей области TNF $\alpha$ -R2 и формирует стабильный комплекс с максимальным значением модуля энергии связывания. Молекула тетрапептида имеет гидрофобные и гидрофильные участки. Гидрофобные участки имеют заряд. С помощью именно этих участков тетрапептид взаимодействует с ФНО- $\alpha$  (рисунок 1).



**Рис. 1** – Молекулярные модели тетрапептида Trp-Asn-Trp-Val

При взаимодействии цитокина с олигопептидом место связывания его с мономерной формой ФНО- $\alpha$  находится в зоне межмолекулярного контакта цитокина и рецептора (рисунок 2).

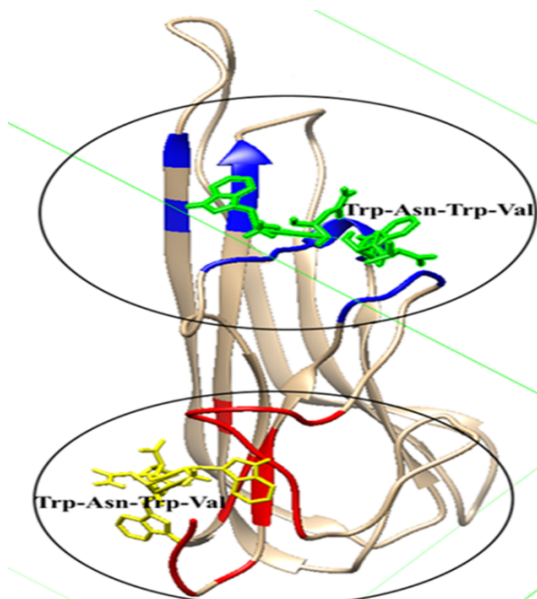


Рис. 2 – Комплекс мономера ФНО- $\alpha$  с Trp-Asn-Trp-Val

При взаимодействии с тримерной формой цитокина данный олигопептид встраивается в пространство между мономерными субъединицами ФНО- $\alpha$  (рисунок 3).

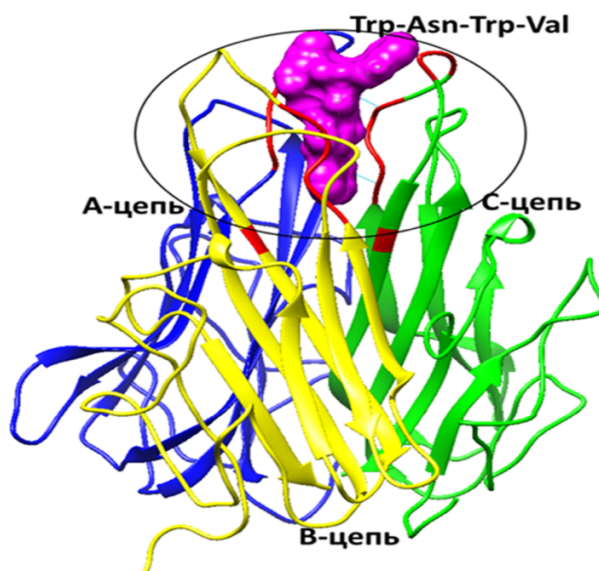


Рис. 3 – Комплекс тримера ФНО- $\alpha$  с тетрапептидом Trp-Asn-Trp-Val

**Выводы.** Оценка эффективности связывания олигопептидов с ФНО- $\alpha$  позволила установить особенности взаимодействия олигопептидов с провоспалительными цитокинами и определить наиболее перспективные олигопептиды для дальнейшего исследования. Тетрапептид Trp-Asn-Trp-Val, являющийся структурным аналогом цитокинсвязывающей области TNFRSF1B, среди

всех исследуемых олигопептидов имеет максимальное по модулю значение свободной энергии связывания с ФНО- $\alpha$  |7,2 (7,1; 7,5)| ккал/моль.

### Литература

1. Aggarwal, B. B. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey / B. B. Aggarwal, S. C. Gupta, J. H. Kim // *Blood*. – 2012. – Vol. 119, No. 3. – P. 651–665.
2. Esposito, E. TNF-alpha as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma / E. Esposito, S. Cuzzocrea // *Curr Med Chem*. – 2009. – Vol. 16, № 24. – P. 3152–3167.
3. Into the eye of the cytokine storm / J. R. Tisoncik [et al.] // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2012. – Vol. 76, No. 1. – P. 16–32.
4. Kang, S. TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s) / S. Kang, T. Kishimoto // *Micropscopy Research and Technique*. – 2000. – Vol. 50. – P. 184–195.
5. Transmembrane TNF-alpha: Structure, function and interaction with anti-TNF agents / T. Horiuchi [et al.] // *Rheumatology*. – 2010. – Vol. 49. – P. 1215–1228.