

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН
НА СТАБИЛЬНОСТЬ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА
ЧЕЛОВЕКА И ЕГО СРОДСТВО К РЕЦЕПТОРУ
С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ НОВОГО ПРЕПАРАТА
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ**

Козел В.А., Побойнев В.В., Козел А.Р.

Козел В.А.

*Студент 6 курса лечебного факультета
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Беларусь
vladislavk200302@gmail.com*

Побойнев В.В.

*Кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры общей химии
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Беларусь
dremozzew@mail.ru*

Козел А.Р.

*Старший преподаватель кафедры общей химии
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Беларусь
arkozel1977@gmail.com*

*В статье проведён *in silico* анализ стабильности эпидермального фактора роста человека (далее — ЭФРЧ). Выявлены два участка с высоким амилоидогенным потенциалом. Посредством алгоритмов PentaFold 3.0, PentUnFOLD, mCsM-PPI2 и молекулярного докинга установлено, что аминокислотные замены M21R и K48R повышают аффинность ЭФРЧ к его рецептору, увеличивают внутреннюю нестабильность белка и не усиливают его склонность к амилоидообразованию. Связывание мутантных форм белка с рецептором происходит в том же сайте, что и у нативного белка.*

Ключевые слова: *эпидермальный фактор роста человека; аминокислотная замена; стабильность белка; аффинность к рецептору; синдром диабетической стопы.*

EVALUATION OF THE INFLUENCE OF AMINO ACID SUBSTITUTIONS ON THE STABILITY OF HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR AND ITS AFFINITY TO THE RECEPTOR IN ORDER TO DEVELOP A NEW DRUG FOR THE TREATMENT OF DIABETIC FOOT SYNDROME

Kozel V. A.

*the 6th year student of the faculty of general medicine of the Educational Institution «Belarusian State Medical University», Minsk
vladislavk200302@gmail.com*

Poboinev V. V.

*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of General Chemistry of the Educational Institution «Belarusian State Medical University», Minsk
dremozzew@mail.ru*

Kozel A. R.

*Senior Lecturer of the Department of General Chemistry of the Educational Institution «Belarusian State Medical University», Minsk
arkozel1977@gmail.com*

In this article the in silico analysis of human epidermal growth factor (hEGF) stability was performed, and mutagenesis of its amyloidogenic fragments was carried out. Two regions with high amyloidogenic potential were identified. Using PentaFold 3.0, PentUnFOLD, mCSM-PPI2 algorithms and molecular docking was established that amino acid substitutions M21R and K48R increase affinity of hEGF to receptor, enhance intrinsic protein instability and do not increase its propensity for amyloid formation. Mutant forms of hEGF have the same binding site with receptor as the native protein.

Key words: *human epidermal growth factor; amino acid substitution; protein stability; receptor affinity; diabetic foot syndrome.*

Сахарный диабет (далее — СД) представляет собой группу эндокринных заболеваний, характеризующихся хронической гипергликемией, возникающей вследствие абсолютной или относительной недостаточности инсулина. Заболевание дезорганизует весь обмен веществ и ведёт к серьёзным повреждениям в организме, особенно страдают нервные ткани и кровеносные сосуды. Мировая статистика говорит о стремительном росте: количество пациентов с СД подскочило со 108 миллионов в 1980 году до 422 миллионов в 2014-м и 828 миллионов к 2022 году [1]. Преждевременная смертность от СД увеличилась на 5 % в период с 2000 по 2016 год. В Республике Беларусь распространённость СД также неуклонно растёт: на начало 2020 года под наблюдением состояло 352 538 пациентов, из них 18 110 с СД I типа [2]. К числу самых серьёзных последствий сахарного диабета относится синдром диабетической стопы (СДС) — совокупность структурных и функциональных нарушений, возникающих на почве диабетической нейропатии, а также поражения мелких и крупных сосудов. Это состояние провоцирует ча-

стые травмы и инфицирование мягких тканей стопы, ведёт к гнойно-некротическому поражению и в далеко зашедших случаях заканчивается ампутацией ноги. СДС в десять раз чаще формируется у лиц с диабетом 2-го типа, и как минимум у 47 % больных лечение начинается позже оптимального срока, следствием чего становятся ампутации, которые повышают смертность вдвое, а стоимость терапии — втрое [3]. У больных сахарным диабетом падает уровень факторов роста в тканях, в первую очередь эпидермального фактора роста человека (ЭФРЧ), что замедляет заживление ран и ведёт к образованию хронических, длительно не заживающихся язв. Введение экзогенного ЭФРЧ непосредственно в дно и края раневого дефекта стимулирует более активное образование грануляционной ткани и ускоряет эпителизацию [3].

Лекарственный препарат Heberprot-R, содержащий рекомбинантный ЭФРЧ, доказал свою клиническую эффективность: полный грануляционный ответ был достигнут у всех пациентов в среднем за $23,6 \pm 3,8$ дня, а полное закрытие раны было получено у 85 % пациентов в среднем за $43 \pm 8,9$ дня. В эксперименте также было показано, что введение эпидермального фактора роста мышам с СД вызывает не только заживление, но и снижение уровня глюкозы и увеличение секреции инсулина [4]. Таким образом, препараты на основе ЭФРЧ имеют выраженное терапевтическое действие. Однако длительность лечения может достигать нескольких месяцев, и препарат эффективен не у всех пациентов. Внесение аминокислотных замен в структуру ЭФРЧ с целью повышения его сродства к рецептору является перспективным подходом для создания более действенного препарата.

Целью настоящего исследования является выбор аминокислотных замен в эпидермальном факторе роста человека, повышающих его аффинность к рецептору, увеличивающих внутреннюю нестабильность белка и при этом не увеличивающих его амилоидогенный потенциал.

Объектом исследования является аминокислотная последовательность ЭФРЧ, полученная из базы данных Protein Data Bank [5]. Анализ стабильности структуры ЭФРЧ и влияния аминокислотных замен на неё проводили с помощью алгоритмов PentaFold 3.0 и PentUnFOLD [6, 7]. Данные алгоритмы работают с 3D-структурами белков и требуют предварительного определения вторичной структуры при помощи алгоритма DSSP. Для оценки изменения стабильности белка в результате аминокислотных замен использовали алгоритм iStable, определяющий параметр $\Delta\Delta G$ ($\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{исх}} - \Delta G_{\text{мут}}$) при физиологических условиях ($T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ и $pH = 7,4$) [8]. Построение трёхмерных моделей ЭФРЧ — как исходного, так и несущего аминокислотные замены — выполняли в программе Swiss Model, взяв за основу пространственную структуру нативного белка [9]. Для изучения взаимодействия ЭФРЧ с рецептором проводили молекулярный докинг с помощью программы HEX 8.0.0 [10]. Для оценки того, насколько мутантная форма ЭФРЧ изменила своё сродство к рецептору, применили два подхода. В частности, использовали алгоритм mCsM-PPI2, который вычисляет влияние аминокислотных замен на межбелковые взаимодействия внутри уже образовавшегося комплекса, и с помощью программы PRODIGY, обрабатывающей структуры комплексов после докинга и рассчитывающей ΔG связывания. Положительное

значение $\Delta\Delta G$ указывает на увеличение сродства [11, 12]. Амилоидогенные фрагменты ЭФРЧ и влияние на них аминокислотных замен определяли с помощью программы FoldAmyloid [13].

Согласно алгоритму PentaFold 3.0 лишь 5 аминокислотных остатков являются стабильными (Cys20, Met21, Tyr22, Cys33, Tyr37), а 6 — метастабильными (Ile23, Ala30, Cys31, Asn32, Ile38, Arg41). Вторичная структура представлена четырьмя бета-тяжами (Val19–Ile23, Lys28–Cys33, Tyr37–Ile38, Tyr44–Arg45), которые отличаются по уровню стабильности: первый и третий являются стабильными, второй — метастабильным, а четвёртый — нестабильным. N- и C-концы белка, а также петли между бета-тяжами являются нестабильными (рис. 1).

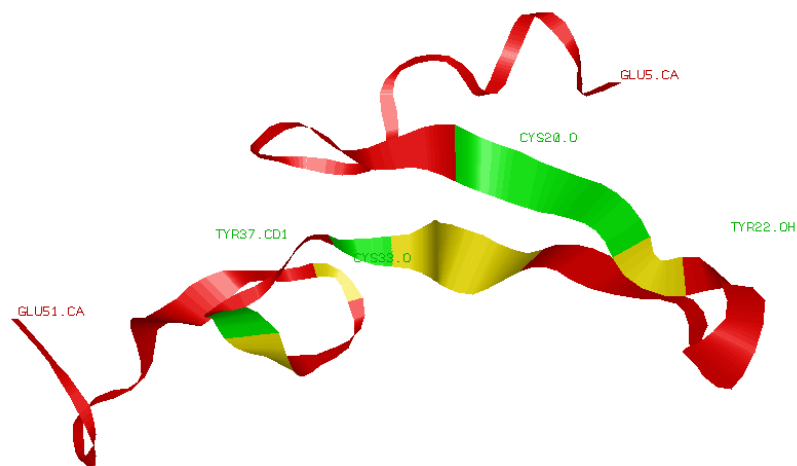


Рис. 1. Стабильность структуры нативного эпидермального фактора роста человека (PDB ID: 1IVO). Зелёным цветом обозначены стабильные элементы вторичной структуры, жёлтым — метастабильные, красным — нестабильные

С помощью алгоритма PentUnFOLD показано, что первый бета-тяж может укорачиваться на один остаток с N-конца. Второй бета-тяж также способен к укорочению так, как только Asn32 и Cys33 признаны стабильными. Особого внимания заслуживает четвёртый бета-тяж: согласно версии 1D алгоритма он нестабилен, а согласно версии 2D — стабилен. Обе версии указывают на способность данного бета-тяжа к переходу в полностью неструктурированное состояние, что, по-видимому, необходимо белку для формирования термодинамически выгодного комплекса с рецептором. С помощью программы FoldAmyloid в структуре ЭФРЧ было обнаружено два фрагмента, обладающих высоким амилоидогенным потенциалом: Cys20–Glu24 и Cys42–Leu52. Наличие таких фрагментов на C-конце молекулы может способствовать образованию бета-амилоида и снижать биодоступность и терапевтическую эффективность препарата на основе ЭФРЧ. Для снижения амилоидогенного потенциала и улучшения свойств белка был проведён обширный *in silico* мутагенез. Аминокислотные остатки из амилоидогенных фрагментов и прилежащих к ним областей (по 5 остатков с каждой стороны от Cys20–Glu24) заменяли на все 19 возможных вариантов. Остатки цистеинов (Cys20, Cys42), формирующие дисульфидные связи, мутагенезу не подвергали. Общее количество проведённых замен составило 437. Согласно гипотезе, выдвинутой нами, понижение стабильности белка с одновременным понижением вероятности образования бета-амилоида должно повысить его сродство к рецептору.

Из 437 замен было выявлено 30, которые способствуют структурному переходу бета-тяжей в петли и/или в полностью неструктурированное состояние. Дальнейший анализ стабильности мутантных форм белка с помощью программы iStable показал, что большинство аминокислотных замен, отобранных по критерию повышения нестабильности белка, также снижают его термодинамическую стабильность ($\Delta\Delta G < 0$). Программа mCsM-PPI2 показала, что большинство аминокислотных замен на С-конце белка снижают аффинность ($\Delta\Delta G < 0$). Среди наиболее перспективных замен, увеличивающих сродство, были выделены Q43E, Y44T, Y44H, R45K, D46N, и K48R. В области середины белка наибольшее увеличение $\Delta\Delta G$ наблюдалось для замен M21Y, M21F, K28Q, K28S, K28H, а также M21R. Программа PRODIGY, работающая с результатами молекулярного докинга, позволила верифицировать полученные данные. Оказалось, что только для ряда замен обе программы дали согласованный положительный результат: M21R, K48R, A25W, K28Q, K28S, K28H, R45K и E51P. Особое внимание привлекли замены M21R и K48R: K48R показала максимальное значение $\Delta\Delta G$ среди всех изученных вариантов (1.528 ккал/моль по mCsM-PPI2), а M21R ($\Delta\Delta G = 0.616$ ккал/моль по mCsM-PPI2) не только увеличивала аффинность, но и, согласно алгоритму PentUnFOLD, в значительной степени увеличивала способность первого бета-тяжа и прилежащих участков к переходу в полностью неструктурированное состояние. При этом молекулы ЭФРЧ с аминокислотными заменами M21R и K48R располагаются в том же сайте связывания, что и нативный белок (рисунки 2 и 3).

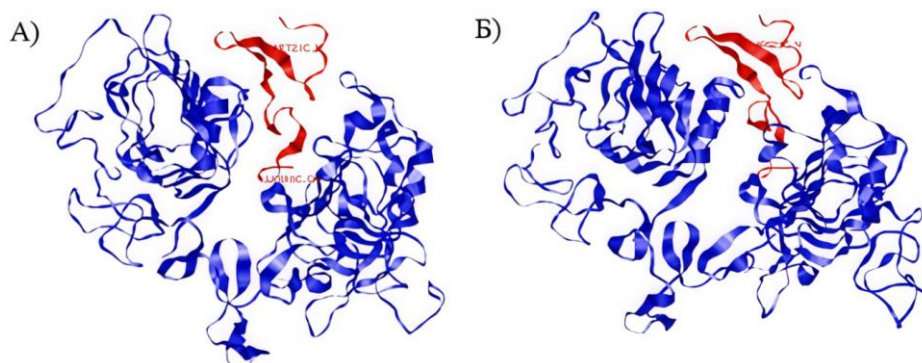


Рис. 2. Модель комплекса ЭФРЧ (А) и ЭФРЧ с аминокислотной заменой M21R (Б) с его рецептором. Красным цветом обозначен ЭФРЧ, а синим — рецептор ЭФРЧ.

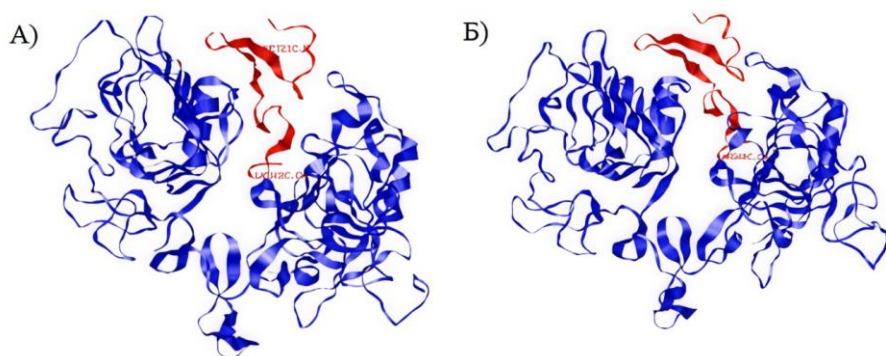


Рис. 3. Модель комплекса нативного ЭФРЧ (А) и ЭФРЧ с аминокислотной заменой K48R (Б) с его рецептором. Красным цветом обозначен ЭФРЧ, а синим — рецептор ЭФРЧ

С помощью программы Prodigy показано, что при 37°C ΔG нативного ЭФРЧ с рецептором составляет -16.2 ккал/моль. После внесения замены M21R ΔG снизилось до -16.5 ккал/моль, а после замены K48R — до -16.4 ккал/моль. Важнейшим критерием отбора аминокислотных замен было их влияние на склонность белка к амилоидообразованию. При анализе аминокислотных замен M21R и K48R показано, что ни одна из них не приводит к увеличению длины или появлению новых амилоидогенных фрагментов в структуре ЭФРЧ. Амилоидогенный профиль мутантных белков, по данным FoldAmyloid, остаётся идентичным профилю нативного белка или несколько снижается (рисунки 4 и 5).

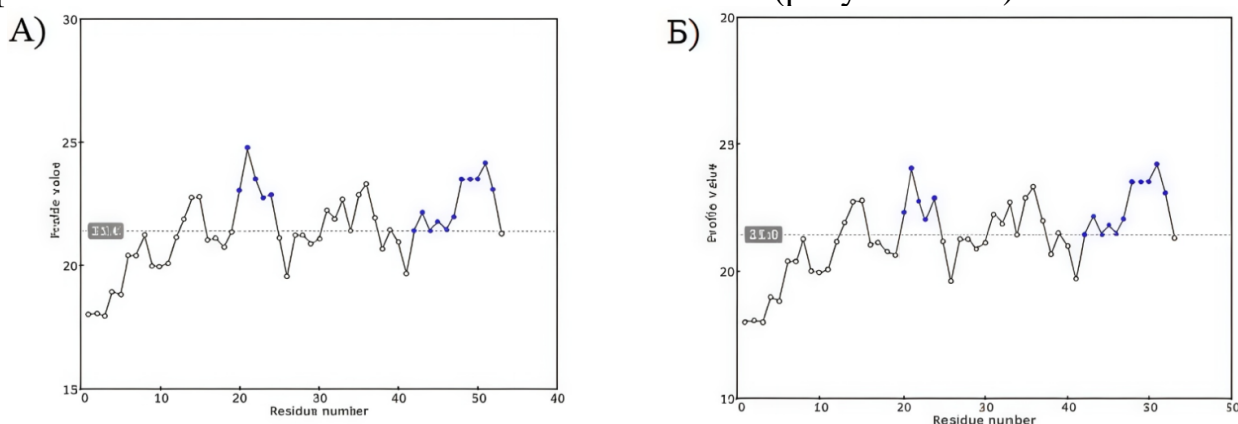


Рис. 4. Амилоидогенный потенциал нативного ЭФРЧ (А) и ЭФРЧ с аминокислотной заменой M21R (Б)

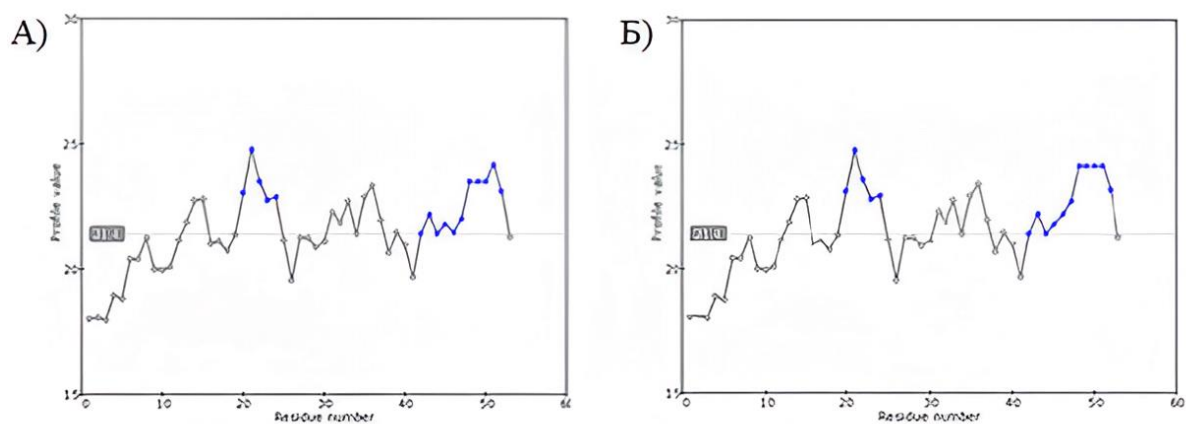


Рис. 5. Амилоидогенный потенциал нативного ЭФРЧ (А) и ЭФРЧ с аминокислотной заменой K48R (Б)

Таким образом, по совокупности результатов *in silico* исследований, аминокислотные замены M21R и K48R являются наиболее перспективными кандидатами для дальнейших *in vitro* и *in vivo* испытаний. Они удовлетворяют всем трём ключевым критериям: повышают сродство ЭФРЧ к рецептору, увеличивают внутреннюю нестабильность белка и не усиливают его амилоидогенные свойства. Внедрение данных замен может лечь в основу создания нового, более эффективного отечественного препарата для терапии синдрома диабетической стопы.

Список литературы

1. Worldwide trends in diabetes prevalence and treatment from 1990 to 2022: a pooled analysis of 1108 population-representative studies with 141 million participants [Электронный ресурс] / The Lancet. – Режим доступа: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(24\)02317-fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(24)02317-fulltext). – Дата обращения: 22.04.26.
2. Мохорт, Т. В. Сахарный диабет: обновление классификации и особенности диагностики различных типов: учебно-методическое пособие / Т. В. Мохорт, А. П. Шепелькевич, Е. И. Шишко. – Минск: БГМУ, 2021. – 39 с.
3. Lee, H. Y. Epidermal growth factor increases insulin secretion and lowers blood glucose in diabetic mice // H. Y. Lee [et al.] // J. Cell Mol. Med. – 2008. – Vol. 12. – P. 1593–1604.
4. Козел, В. А. Оценка стабильности эпидермального фактора роста человека в рамках разработки нового препарата для лечения синдрома диабетической стопы / В. А. Козел // «Актуальные проблемы современной медицины и фармации – 2022»: сборник материалов докладов LXXXVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых учёных; под редакцией С. П. Рубниковича, В. А. Филонюка. – Минск: БГМУ, 2022. – С. 1001–1005.
5. The Protein Data Bank / H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2000. – Vol. 28. – P. 235–242/
6. Khrustalev, V. V. The PentaFOLD 3.0 Algorithm for the selection of stable elements of secondary structure to be included in vaccine peptides / V. V. Khrustalev // Protein Pept. Lett. – 2021. – Vol. 28. – P. 573-588.
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. – P. 1155–1171.
8. Chen, C.W. iStable 2.0: Predicting protein thermal stability changes by integrating various characteristic modules // C. W. Chen, M. H. Lin, C. C. Liao [et al.] // Comput. Struct. Biotechnol. J. – 2020. – Vol. 18. – P. 622-630/
9. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes // A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2018. – Vol. 46. – P. 296–303.
10. Ghoorah, A. W. Protein Docking Using Case-Based Reasoning / A. W. Ghoorah, M. Smail-Tabbone, M.-D. Devignes [et al.] // Proteins: Structure, Function, Bioinformatics. – 2013. – Vol. 81. – P. 2150–2158.
11. mCSM-PPI2: predicting the effects of mutations on protein–protein interactions / H. M. C. Rodrigues, Y. Myung, D. E. V. Pires [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2019. – Vol. 47. – P. 338–344.
12. Xue, L. C. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes / L. C. Xue [et al.] // Bioinformatics. – 2016. – Vol. 32. – P. 3676–3678.
13. Garbuzynskiy, S. O. FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence / S. O. Garbuzynskiy, M. Y. Lobanov, O. V. Galzitskaya // Bioinformatics. – 2010. – Vol. 26. – P. 326–332.