

ДИЗАЙН И АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ГИБРИДНОГО БЕЛКА ANGPT1_VEGF165 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

А.Б. Саченко, Е.А. Попичева, В.В. Щур, А.В. Янцевич

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
E-mail: antosuk@yandex.ru*

В данной работе проведен анализ траекторий молекулярной динамики и пространственных структур гомологичных моделей гибридных белков ANGPT1_VEGF165 с различными линкерами. Установлено, что более предпочтительным являются гибкие линкеры GGGsGGGGsGGGsGGGs, GGGGsGGGGsGGGGs, GGGsGGGGs для ANGPT1_VEGF165 гибридного белка и PAPAPAP, GGGGsGGGGs, GGGsGGGGsGGGGsGGGs, GGGGsGGGGsGGGGsGGGGs для VEGF165_ANGPT1 гибридного белка.

Ключевые слова: молекулярная динамика; гибридный белок; ANGPT1; VEGF165; ангиогенез.

Введение. Хроническая ишемия нижних конечностей является одной из самых распространенных и актуальных патологий сердечно-сосудистой системы человека. Среди населения старше 50 лет распространенность этого заболевания составляет 5-8%, а при наличии таких факторов риска, как курение, гиперлипидемия, артериальная гипертензия или сахарный диабет достигает 30% [1].

Ишемия конечностей чаще всего вызвана атеросклерозом и окклюзией в периферических артериях. Прогрессирование хронической ишемии нижних конечностей приводит к ампутации с той же частотой, что и несколько десятков лет назад, а традиционные методы лечения заболевания показывают недостаточно высокую эффективность. Поэтому существует явная необходимость в новых эффективных методах лечения пациентов, страдающих от ишемии конечностей во всем мире [2]. В настоящее время перспективным методом лечения ишемии нижних конечностей является терапевтический ангиогенез, основанный на введении в ишемизированные ткани генетических конструкций с белками активаторами ангиогенеза VEGF165 (изоформа эндотелиального фактора роста сосудов длиной в 165 аминокислот) и ANGPT1.

Препараты на основе плазмидной ДНК с генами VEGF165 и ANGPT1 продемонстрировали высокую эффективность при лечении хронической ишемии ПА и ПБ степени [3]. Комбинированное применение препаратов на основе генов VEGF165 и ANGPT1 позволяет с большей эффективностью формировать новые сосуды для устойчивой неоваскуляризации, чем применение только одного из препаратов. Создание генетической конструкции кодирующей гибридный белок ANGPT1_VEGF165

может существенно увеличить терапевтический эффект и расширить спектр действия препарата [2].

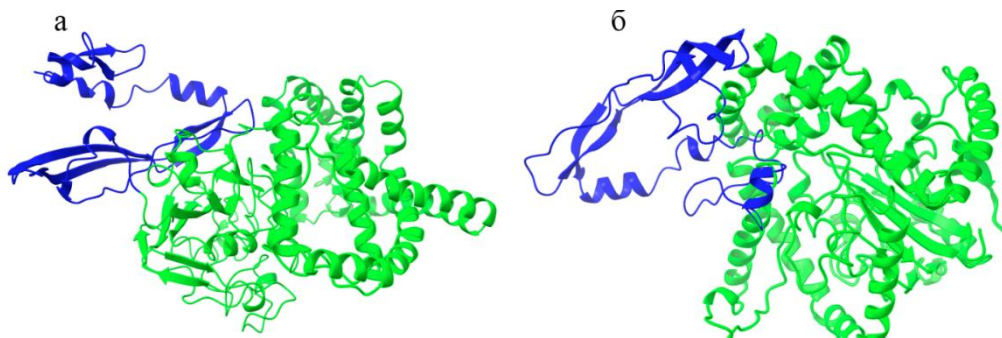
Для определения оптимального расположения доменов, а также установления оптимальной длины и аминокислотного состава пептидного линкера между двумя белками проведен анализ траекторий молекулярной динамики и пространственных структур гомологичных моделей гибридных белков ANGPT1_VEGF165.

Методы. Модели гибридных белков построены методом гомологичного моделирования (комбинацией онлайн сервиса Robetta [4] и программы Modeller 10.0). В качестве шаблонов для ANGPT1 и VEGF165 использовали гомологичные модели белков, представленные в базе данных Protein Data Bank (PDB): 1DEQ, 1EI3, 1LWU, 1M1J, 1Z3U, 3GHD, 4EPU, 4JYO, 4JZC, 4ZFG, 1FZV, 1MJV, 1MKG, 1RV6, 1WQ8, 1WQ9, 3P9W, 3V2A, 3V6B, 4DEQ, 5FV1, 5O4E, 6T9D, 6ZFI. Оптимизированные для экспрессии в клетках человека аминокислотные последовательности ANGPT1 и VEGF165 взяты из экспрессионных векторов, полученных нами ранее, а использованные линкеры выбраны из литературных источников, где они применялись для создания гибридных белков.

Валидацию полученных моделей проводили с помощью программы ChimeraX v 1.6 (визуальная проверка моделей на правильное формирование функциональных доменов и фолдинга белка), а также при помощи онлайн сервиса SWISS-Model Structure Assessment [5] (по карте распределения двугранных углов и показателю QMEAN – описывающему основные геометрические аспекты белковой структуры).

Дальнейшую валидацию моделей проводили с использованием метода молекулярной динамики (МД) в программе AMBER16 в силовом поле Amber (набор параметров ff14). Перед МД систему подвергали процедуре оптимизации: минимизация в течение 20000 шагов с использованием метода сопряженных градиентов, нагрев в течение 5 нс до температуры 310 К (NVT ансамбль). Моделирование свободной динамики проводили в течение 50 нс (NPT ансамбль) при температуре в 310 К и постоянном давлении в 1 атм.

Результаты. Присоединение белка VEGF165 по N концу белка ANGPT1 требует линкера длиной не менее 10 аминокислот. Это обусловлено нахождением N-конца белка ANGPT1 внутри белковой глобулы (рис. 1), что существенно усложняет её доступность. С конец белка ANGPT1 более доступен и позволяет использовать линкеры длиной от 5 аминокислот. В результате первичного осмотра моделей выбраны 66 моделей (из 95) гибридных белков для дальнейшей их проверки методом МД.



Модели гибридных белков с присоединением VEGF165 (а, синий) по С концу ANGPT1 (зеленый) и с присоединением (б) VEGF165 по N концу ANGPT1

В результате анализа МД пространственных структур полученных моделей определены (с наилучшими показателями стабильности, незначительные колебания СКО, радиуса гирации и изменения количества образованных и разрушенных водородных связей, а также наименьшим радиусом гирации) оптимальные гибкие линкеры GGGsGGGGsGGGsGGGs, GGGGsGGGGsGGGGs, GGGsGGGGs для ANGPT1_VEGF165 гибридного белка и PAPAPAP, GGGGsGGGGGs, GGGsGGGGsGGGGsGGGs, GGGGsGGGGsGGGGsGGGGs для VEGF165_ANGPT1 гибридного белка. Выбранные линкеры обеспечивают высокую стабильность гибридного белка и подвижность доменов относительно друг друга.

Вывод. В ходе анализа траекторий МД и пространственных структур гомологичных моделей гибридных белков VEGF165_ANGPT1 и ANGPT1_VEGF165 определены предпочтительные линкеры, которые будут использованы для создания соответствующих генетических конструкций, кодирующих гибридные белки для лечения ишемии нижних конечностей.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. ACC/AHA guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction: executive summary: a report of the American College of Cardiology. / Ryan T.J. [et. al.] // Circulation. 1996. Vol. 94. P. 2341-2350.
2. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. / Isner J.M. [et. al.] // Circulation. 1995. Vol. 91. P. 2687-2692.
3. Червяков Ю.В., Власенко О.Н. Эффективность генной терапии и стандартного консервативного лечения хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза. // Вестник хирургии имени ИИ Грекова. 2018. Т. 177. С. 64-71.
4. Kim D.E, Chivian D., Baker D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. // Nucleic Acids Research. 2004. Vol. 32. P. 526-531.
5. Benkert P., Biasini M., Schwede M. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. // Bioinformatic. 2011. Vol. 27. P. 343-350.