

Т. В. Рябцева, Д. А. Макаревич, А. Д. Таганович

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

МОДЕЛИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОЛИГОПЕПТИДОВ С ФАКТОРОМ НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ-АЛЬФА

Аннотация. Целью исследования являлось конструирование, физико-химическая характеристика и анализ эффективности взаимодействия ФНО α с олигопептидами-аналогами участка взаимодействия ФНО α с ФНО α -R2. Приведены результаты анализа зоны контакта ФНО α с ФНО α -R2, определены потенциально наиболее эффективные олигопептиды, изучены свободная энергия связывания олигопептидов с ФНО α , изменение эффективности взаимодействия в зависимости от количества аминокислотных остатков в пептидной цепи, а также формы ФНО α (мономер или тример). На основании полученных данных описаны наиболее типичные локусы взаимодействия цитокина с олигопептидами. Для подтверждения правильности проведенных расчетов проведена оценка эффективности отобранных олигопептидов в экспериментах *in vitro*.

Для визуализации молекулярного комплекса и работы с pdb-файлом использовали программное обеспечение Chimera 1.14 с утилитой AutoDocVina, для исследований *in vitro* – наборы реактивов для определения концентрации ФНО α методом непрямого иммуноферментного анализа. Исходная концентрация олигопептидов – 10 μ моль, исходные концентрации ФНО α ($\times 10^{-8}$): 0; 0,0287; 0,0862; 0,2300; 0,5750; 1,4370 μ моль.

При взаимодействии олигопептидов с мФНО α отмечалось повышение эффективности связывания при увеличении количества аминокислотных остатков в цепи. При взаимодействии с трФНО α такой зависимости не наблюдалось. Анализ значений энергии связывания ди-, три- и тетрапептидов показал их статистически значимые различия при связывании с мФНО α и статистическую недостоверность различий при связывании с трФНО α .

Таким образом, полученные данные позволили сделать следующие выводы: 1) энергия взаимодействия олигопептидов с трФНО α не зависит от количества аминокислотных остатков в олигопептиде; 2) тримеризованная форма ФНО α более эффективно взаимодействует с олигопептидами по сравнению с мФНО α ; 3) олигопептиды, содержащие аминокислотный остаток -Trp- и являющиеся пространственным аналогом фрагмента ФНО α -R2 (-Trp⁶⁵-Asn⁶⁶-Trp⁶⁷-Val⁶⁸-Pro⁶⁹-), эффективнее взаимодействуют с молекулой ФНО α ; 4) отобранные олигопептиды (Trp-Asn-Trp, Trp-Val-Pro, Trp-Asn-Trp-Val) наиболее перспективны для связывания ФНО α . Результаты экспериментов *in vitro* подтвердили эффективность только одного (Trp-Asn-Trp) из трех олигопептидов.

Ключевые слова: олигопептиды, фактор некроза опухоли-альфа, цитокины, константа связывания, молекулярный докинг

Для цитирования: Рябцева, Т. В. Моделирование и анализ взаимодействия олигопептидов с фактором некроза опухоли-альфа / Т. В. Рябцева, Д. А. Макаревич, А. Д. Таганович // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2021. – Т. 66, № 4. – С. 453–461. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-4-453-461>

Tatiana V. Ryabtseva, Denis A. Makarevich, Anatoliy D. Taganovich

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

MODELING AND INTERACTION ANALYSIS OF THE TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA WITH OLIGOPEPTIDES

Abstract. The aim of the study was the design, characteristics and analysis of the TNF α interaction with oligopeptide-analogs of the interaction site of TNF α with TNF α -R2. Here are the results of the analysis contact zone of TNF α with TNF α -R2, determination of the potentially most effective oligopeptides, study of the binding free energy of oligopeptides and its changes depending on the number of amino acid residues in the peptide chain, as well as the TNF α form (monomer or trimer). Here are described the most typical loci of oligopeptides interaction with cytokine. To confirm the calculations, the effectiveness of the selected oligopeptides was evaluated in experiments *in vitro*.

For visualization of the molecular complex and work with the pdb file we are used Chimera 1.14 software with AutoDocVina utility. For *in vitro* studies, were used indirect enzyme immunoassay reagent kits. The initial concentration of oligopeptides is 10 μ M, the initial concentration of TNF α ($\times 10^{-8}$): 0; 0.0287; 0.0862; 0.2300; 0.5750; 1.4370 μ M.

When oligopeptides interact with mTNF α , the binding efficiency increase was observed with an increase in the number of amino acid residues in the chain. With tTNF α , such dependence was not observed. A statistically significant difference was

observed in the binding energy of di-, tri-, and tetra peptides with mTNF α , with tTNF α , the differences found were not statistically significant.

Thus, the data were obtained, which allowed us to come to the following conclusions: 1) the energy of interaction of oligopeptides with tTNF α does not depend on the number of amino acid residues in the oligopeptide; 2) the trimerized form of TNF α interacts most effectively with oligopeptides in comparison with mTNF α ; 3) oligopeptides containing the -Trp- and being a spatial analogue of the TNF α -R2 fragment (-Trp65-Asn66-Trp67-Val68-Pro69-) interact most effectively; 4) it was selected three oligopeptides are the most promising for the binding of TNF α . The experiments *in vitro* confirmed the effectiveness only one oligopeptide.

Keywords: oligopeptides, tumor necrosis factor-alpha, cytokines, binding constant, molecular docking

For citation: Ryabtseva T. V., Makarevich D. A., Taganovich A. D. Modeling and interaction analysis of the tumor necrosis factor-alpha with oligopeptides. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 4, pp. 453–461 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-4-453-461>

Введение. Фактор некроза опухоли (ФНО) был открыт и идентифицирован в середине 1980-х годов. Первоначально функция ФНО была определена лишь как фактор, способствующий некрозу клеток опухоли [1, 2]. После появления рекомбинантного белка ФНО свойства данного белка были изучены более детально, что позволило обнаружить другие многочисленные биологические функции ФНО. Известно, что ФНО является плейотропным цитокином, обладающим многочисленными системными эффектами, такими как пирогенное действие, индукция синтеза острофазных белков, активация системы свертывания, индукция синтеза ИЛ-6 и ИЛ-1, резорбция костей, кахексия [3, 4]. ФНО α экспрессируется в виде трансмембранного тримерного белка (трФНО α). Этот белок связывается гомотримерными трансмембранными рецепторами: ФНО α -R1 (55 кДа) – CD120a и ФНО α -R2 (75 кДа) – CD120b [3]. ФНО α -R1 обладает провоспалительными и апоптотическими эффектами, ФНО α -R2 – множеством иммунорегуляторных и противовоспалительных функций [5, 6]. Комплекс ФНО α с ФНО α -R2 является мишенью для разработки новых лекарственных препаратов для лечения рака, аутоиммунной патологии, аллергии и других заболеваний [7–9]. Рецептор ФНО α -R2 – хороший прототип для моделирования олигопептидов, способных связывать ФНО α в плазме крови человека.

Существуют разработки антагонистов ФНО α на основе рекомбинантных белков и моноклональных антител. Однако эти препараты обладают рядом побочных эффектов, которые значительно превышают их клиническую эффективность [10–12]. Аптамеры (ssDNA, RNA, олигонуклеотиды и пептидные молекулы) обладают высокой специфичностью и аффинностью для связывания молекул-мишеней [13–15]. Поэтому разработка ингибиторов ФНО α на основе синтетических олигопептидов, на наш взгляд, является перспективной и актуальной задачей биохимии.

Моделирование биомолекул *in silico* становится все более популярным направлением исследований, ориентированных на поиск новых биологически активных соединений. С помощью методов молекулярного моделирования можно получить предварительную информацию о возможных способах специфического связывания молекулы-мишени, что позволит сократить финансовые и временные расходы на создание новых фармакологических препаратов [16–18].

Цель данного исследования – конструирование, физико-химическая характеристика и анализ эффективности взаимодействия ФНО α с олигопептидами-аналогами участка взаимодействия ФНО α с ФНО α -R2.

Основными задачами исследования являлись: выделение и анализ зоны контакта ФНО α с ФНО α -R2, построение олигопептидов и определение потенциально наиболее эффективных, анализ изменения свободной энергии связывания олигопептидов с ФНО α в зависимости от количества аминокислотных остатков, сравнительный анализ эффективности взаимодействия олигопептидов с мономерной и тримерной формами ФНО α , описание наиболее типичной локализации олигопептидов на поверхности молекулы ФНО α . Завершающим этапом исследования являлась оценка эффективности отобранных олигопептидов в экспериментах *in vitro* для подтверждения правильности проведенных расчетов.

Материалы и методы исследования. Начальным этапом компьютерного моделирования в исследовании являлся поиск pdb-файла, содержащего структурные данные молекулярного комплекса целевого белка (ФНО α) с его рецептором. Данный поиск проводили в международной

базе данных Protein Data Bank. По ключевому слову *TNF-TNFR2 complex* было найдено 126 411 структур. Для анализа использовали pdb-файл 3ALQ, для визуализации молекулярного комплекса и работы с pdb-файлом – программное обеспечение Chimera 1.14 с утилитой AutoDoc Vina, для построения аминокислотной последовательности – программу PyMOL. Всего было сконструировано 42 олигопептида с ФНО α (из них 15 – дипептиды), 14 трипептидов и 13 тетрапептидов и проанализированы особенности их взаимодействия. Анализ взаимодействия каждого из олигопептидов проводили и с мономером (мФНО α), и с трФНО α .

В исходном файле виртуального докинга определяли и удаляли гипотетически функционально незначимые части молекул. Затем с помощью команды <Dockprepare> проводили протонирование, H- и C-кэппинг, релаксацию, ионизацию боковых цепей аминокислот как в молекуле ФНО- α , так и в молекуле олигопептида, а затем построение пространственно-рецепторной решетки сайта связывания. В данном случае в куб включали всю поверхность молекулы цитокина.

Для изучения взаимодействия трФНО α использовали координаты центра куба (Cx:20, Cy:50, Cz:40), размеры куба (Sx:80, Sy:75, Sz:75), для изучения взаимодействия мФНО- α – координаты центра куба (Cx:10, Cy:50, Cz:47), размеры куба (Sx:50, Sy:50, Sz:50).

Каждый лиганд случайным образом располагался в кубе и имел случайную конформацию, которая описывалась набором чисел. Финальную энергию для лучших кластеров рассчитывали как разность между значениями энергии перехода рецептора с лигандом из несвязанного положения в связанное. Результатом анализа являлась энергия ΔG (ккал/моль) и положение лиганда в активном центре рецептора. Разница энергии лигандов показывает, насколько один лиганд лучше связывается рецептором, чем другой. Положение лиганда в активном центре позволяет предсказывать механизм связывания [19, 20].

Для подтверждения правильности расчетов изучена эффективность перспективных олигопептидов *in vitro*. Концентрацию ФНО α определяли методом непрямого иммуноферментного анализа, используя наборы реактивов. Олигопептиды для ФНО α (WVP (M = 504,53 Да), WNWV (M = 604,30 Да), WNW (M = 504,53 Да)) были синтезированы на предприятии Changzhou Xuanming Chemical Co. Ltd., (Чанчжоу, Цзянсу, Китай). Исходная концентрация олигопептидов – 10 μ моль, концентрация в лунке – 1 μ моль. Исходные концентрации ФНО α ($\times 10^{-8}$): 0; 0,0287; 0,0862; 0,2300; 0,5750; 1,4370 μ моль. Используемые концентрации цитокинов и олигопептидов создавали избыток молекул олигопептидов по сравнению с молекулами цитокинов. На 1 молекулу цитокина приходилось не менее $1 \cdot 10^9$ молекул олигопептида. Последовательность проведения исследования включала все стандартные для протокола иммуноферментного анализа этапы. Для оценки связывания олигопептидов с цитокинами был добавлен один дополнительный этап. Через 60 мин от начала инкубации растворов цитокинов в соответствующие лунки планшета добавляли растворы олигопептидов. Далее все этапы промывки, добавления конъюгатов, ТМБ и измерение оптической плотности проводили в соответствии с инструкциями к используемому набору реактивов. Реакция взаимодействия олигопептида с цитокином обратима и может быть описана законом действующих масс, что позволяет рассчитать константу связывания олигопептида с цитокином. Константу связывания рассчитывали по формуле: $K_{св} = [Ц + П]/([Ц] + [П])$, где $[Ц + П]$ – концентрация комплекса олигопептида с цитокином, которая рассчитывалась как разность между исходной концентрацией цитокина и его концентрацией после инкубации с олигопептидом: $[Ц + П] = [Ц_{исх}] - [Ц_{после}]$.

Статистическую обработку полученных значений свободной энергии анализировали с помощью программы Statistica 10.0. Для описания результатов вычисляли значения медианы и межквартильного размаха, для сравнительной характеристики независимых выборок (выборка значений по отдельным олигопептидам) – медианный тест и критерий Краскела–Уоллиса, для сравнительной характеристики зависимых выборок (выборка значений по одному олигопептиду при связывании мФНО α и трФНО α) – U-критерий Манна–Уитни и критерий Колмогорова–Смирнова. Сопоставление констант связывания, рассчитанных при использовании различных концентраций цитокинов в среде, осуществляли с помощью дисперсионного анализа, используя критерий Фридмана.

Результаты и их обсуждение. Для выделения участков взаимодействия ФНО α с растворимым рецептором ФНО α -R2 анализировали пространственную структуру комплекса в pdb-файле 3ALQ. Представленная там структура состояла из 12 цепочек. Предварительная подготовка включала удаление 6 цепочек, которые дублировались. Затем удаляли структурные части рецептора, которые не участвовали в образовании межмолекулярного контакта. Анализ проводили на трех полипептидных цепях ФНО α (A, B, C) и трех цепях ФНО α -R2 (R, S, T).

С помощью программного обеспечения были обнаружены две межмолекулярные водородные связи: между Trp⁶⁷ ФНО α -R2 и Ser⁸⁶ ФНО α и между Cys⁷¹ ФНО α -R2 и Ala³³ ФНО α . Они выполняли роль «опорных точек» для выделения пептидной цепи и конструирования олигопептидов-аналогов участка взаимодействия ФНО α с ФНО α -R2. Дальнейший анализ показал, что выделенная аминокислотная последовательность -Gln⁶³-Leu⁶⁴-Trp⁶⁵-Asn⁶⁶-Trp⁶⁷-Val⁶⁸-Pro⁶⁹-Glu⁷⁰-Cys⁷¹-Leu⁷²-Ser⁷³-Cys⁷⁴-Gly⁷⁵-Ser⁷⁶-Arg⁷⁷-Cys⁷⁸- находится в Т-цепи белка ФНО α -R2 и контактирует с А- и С-цепями молекулы ФНО α . Данные аминокислотные остатки, как оказалось, находятся в CRD1-регионе молекулы ФНО α -R2, который считается ответственным за связывание с цитокином, что подтверждается данными литературы [9] и результатами исследования межатомных расстояний в точке контакта молекул (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Анализ межатомных расстояний между аминокислотными остатками ФНО α -R2 (Т-цепь) и ФНО α (А- и С-цепи)

Table 1. The interatomic distances between the TNF-R2 (T-chain) and TNF- α (A- and C-chain) amino acid residues

ФНО α -R2 (Т-цепь)	ФНО α (А-цепь)	ФНО α (С-цепь)	Расстояние, Å
-Gln63-	-Tyr87-		3,107
-Leu64-	-Thr89-		3,518
-Trp65-	-Gln88-		10,606
-Asn66-	-Tyr87-		4,899
-Trp67-*	-Ser86-*		3,372
-Val68-	-Tyr87-		4,421
-Pro69-		-Ala133-	5,689
-Glu70-		-Arg31-	3,256
-Cys71-*		-Ala133-*	2,903
-Leu72-		-Ala133-	3,282
-Ser73-		-Arg32-	2,593
-Cys74-		-Gln21-	3,245
-Gly75-	–	–	–
-Ser76-		-Ala145-	4,456
-Arg77-		-Glu23-	2,763
-Cys78-		-Gln21-	10,307

Пр и м е ч а н и е. * – аминокислотные остатки, участвующие в образовании водородных связей согласно расчетам Chimera 1.14.

Рассчитанная медиана всех измеренных межатомных расстояний в изучаемом участке составила 3,37 [3,10–4,90] Å, что достаточно для возникновения сильных межмолекулярных взаимодействий. Выбранную аминокислотную последовательность разделили на ди-, три- и тетрапептиды, которые были сконструированы для дальнейшего анализа свободной энергии связывания с ФНО α (табл. 2).

Определение свободной энергии связывания олигопептидов с мФНО α и трФНО α позволило отобрать перспективные для химического синтеза соединения, предположительно обладающие способностью максимально эффективно взаимодействовать с ФНО α . Среди дипептидов наилучшие показатели энергии связывания как с мономером, так и с тримером ФНО α показали дипептиды Trp-Asn, Asn-Trp, Trp-Val. Наименее эффективное связывание с ФНО α продемонстрировали дипептиды Cys-Gly, Gly-Ser, Ser-Cys.

Таблица 2. Значения свободной энергии связывания олигопептидов-аналогов цитокинсвязывающей области ФНО α -R2 с ФНО α Table 2. The free binding energy of oligopeptides-analogs of the cytokine-binding region of TNF-R2 with TNF- α

Пептиды	Свободная энергия связывания, – ккал/моль	
	мФНО α	трФНО α
Trp-Asn	5,55 [5,37–5,80]	7,40 [6,95; 7,80]*
Asn-Trp	5,30 [5,20–5,40]	7,40 [6,45; 7,62]*
Trp-Val	5,10 [5,00–5,35]	6,90 [6,00; 7,25]*
Leu-Trp	4,70 [4,60–4,90]	6,05 [5,47; 6,75]*
Gln-Leu	4,40 [4,30–4,50]	5,45 [4,70; 6,12]*
Val-Pro	4,20 [4,10–4,40]	5,90 [5,60; 6,00]*
Pro-Glu	4,20 [4,10–4,30]	5,75 [5,60; 5,90]*
Leu-Ser	4,10 [4,00–4,22]	5,20 [4,37; 5,52]*
Ser-Arg	4,00 [3,80–4,00]	5,60 [4,47; 6,02]*
Arg-Cys	4,00 [3,90–4,10]	6,10 [5,90; 6,20]*
Glu-Cys	3,95 [3,80–4,00]	5,30 [5,30; 5,52]*
Cys-Leu	3,90 [3,70–4,00]	4,85 [4,60; 5,12]*
Ser-Cys	3,90 [3,80–3,95]	4,70 [4,50; 4,90]*
Gly-Ser	3,80 [3,70–3,90]	4,65 [4,40; 4,90]*
Cys-Gly	3,50 [3,40–3,62]	4,25 [4,07; 4,30]*
<i>Все дупептиды</i>	<i>4,10 [3,92–4,55]**</i>	<i>5,60 [5,02; 6,07]*</i>
Trp-Asn-Trp	6,50 [6,40–6,62]	7,25 [6,75; 7,70]*
Leu-Trp-Asn	6,00 [5,90–6,10]	5,90 [5,45; 6,50]
Gln-Leu-Trp	5,80 [5,70–5,60]	6,40 [6,30; 6,55]*
Asn-Trp-Val	5,75 [5,60–5,90]	5,90 [5,77; 6,10]*
Trp-Val-Pro	5,60 [5,37–5,80]	7,30 [7,10; 8,20]*
Pro-Glu-Cys	4,75 [4,70–4,90]	6,05 [5,40; 6,42]*
Val-Pro-Glu	4,70 [4,60–5,00]	5,10 [5,00; 5,12]*
Gly-Ser-Arg	4,55 [4,37–4,72]	6,50 [6,10; 6,80]*
Cys-Leu-Ser	4,45 [4,30–4,52]	5,05 [4,80; 5,20]*
Leu-Ser-Cys	4,40 [4,20–4,50]	5,90 [5,77; 6,20]*
Glu-Cys-Leu	4,35 [4,10–4,50]	5,00 [4,92; 5,10]*
Ser-Arg-Cys	4,30 [4,17–4,40]	5,45 [5,30; 5,90]*
Ser-Cys-Gly	4,20 [4,20–4,32]	5,45 [5,17; 5,70]*
Cys-Gly-Ser	4,20 [4,10–4,30]	5,40 [5,17; 5,72]*
<i>Все трипептиды</i>	<i>4,62 [4,36–5,71]**</i>	<i>5,90 [5,41; 6,30]*</i>
Trp-Asn-Trp-Val	6,75 [6,60; 6,82]	7,20 [7,10; 7,50]*
Asn-Trp-Val-Pro	6,45 [5,97; 6,60]	6,60 [6,20; 6,95]*
Leu-Trp-Asn-Trp	6,30 [6,17; 6,40]	7,10 [6,97; 7,52]*
Trp-Val-Pro-Glu	6,10 [5,77; 6,20]	7,25 [6,40; 7,40]*
Gln-Leu-Trp-Asn	5,60 [5,20; 6,02]	6,05 [5,50; 6,32]*
Pro-Glu-Cys-Leu	5,00 [4,90; 5,12]	5,35 [5,10; 5,72]*
Glu-Cys-Leu-Ser	4,85 [4,80; 5,00]	5,60 [5,17; 6,15]*
Cys-Gly-Ser-Arg	4,75 [4,67; 4,90]	6,95 [6,57; 7,15]*
Val-Pro-Glu-Cys	4,70 [4,60; 4,90]	5,20 [5,00; 5,42]*
Leu-Ser-Cys-Gly	4,70 [4,67; 4,90]	5,50 [5,07; 6,42]*
Ser-Cys-Gly-Ser	4,60 [4,60; 4,82]	6,15 [5,75; 6,52]*
Gly-Ser-Arg-Cys	4,50 [4,47; 4,62]	5,70 [5,00; 6,55]*
Cys-Leu-Ser-Cys	4,50 [4,40; 4,60]	5,10 [4,77; 5,42]*
<i>Все тетрапептиды</i>	<i>4,85 [4,70; 6,10]**</i>	<i>6,05 [5,50; 6,95]*</i>

Примечание. Достоверность различий ($p \leq 0,05$): * – при сравнении энергии связывания в зависимости от формы молекулы ФНО α , ** – при сравнении энергии связывания ди-, три- и тетрапептидов.

Среди трипептидов более эффективными энергиями связывания с мФНО α обладали Trp-Asn-Trp, Leu-Trp-Asn, Gln-Leu-Trp, с трФНО α – Trp-Val-Pro, Trp-Asn-Trp, Gly-Ser-Arg. Наименее эффективная энергия связывания (значения близкие к «0») была для трипептидов с мФНО α у Ser-Arg-Cys, Ser-Cys-Gly, Cys-Gly-Ser, с трФНО α – у Val-Pro-Glu, Cys-Leu-Ser, Glu-Cys-Leu.

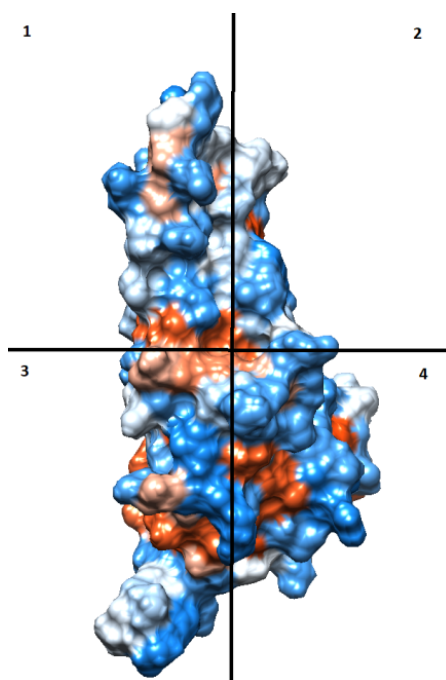
Среди тетрапептидов более эффективная энергия связывания с мФНО α была характерна для Gln-Leu-Trp-Asn, Leu-Trp-Asn-Trp, Trp-Asn-Trp-Val, с трФНО α – Gln-Leu-Trp-Asn, Leu-Trp-Asn-Trp, Trp-Asn-Trp-Val. Наименее эффективное связывание трипептидов с мФНО α у Ser-Cys-Gly-Ser, Cys-Gly-Ser-Arg, Gly-Ser-Arg-Cys, с трФНО α – у Ser-Cys-Gly-Ser, Cys-Gly-Ser-Arg, Gly-Ser-Arg-Cys.

Сравнение всех проанализированных олигопептидов показало, что те из них, которые в своем составе содержат аминокислотный остаток -Trp-, являются более энергетически эффективными. Они характеризуются максимальной энергией взаимодействия (с мФНО α – 5,77 [5,55–6,30] ккал/моль, с трФНО α – 7,00 [6,05–7,30] ккал/моль), чем другие исследованные олигопептиды (с мФНО α – 4,42 [4,10–4,70] ккал/моль, с трФНО α – 5,42 [5,07–5,80] ккал/моль).

При взаимодействии олигопептидов с мФНО α отмечали повышение эффективности связывания при увеличении количества аминокислотных остатков в цепи. При взаимодействии с трФНО α такой зависимости не наблюдали. Анализ значений энергии связывания ди-, три- и тетрапептидов показал статистически значимые различия при их связывании с мФНО α и статистически незначимые различия при связывании с трФНО α (см. табл. 2). Анализ результатов энергии связывания олигопептидов в зависимости от формы ФНО α (мономер и тример) показал, что связывание олигопептидов с трФНО α энергетически более выгодно, чем связывание с мФНО α (табл. 2).

Различия в энергии связывания олигопептидов с разными формами ФНО α могут быть обусловлены локализацией взаимодействия олигопептидов на поверхности молекулы трФНО α . В 97 % наблюдений олигопептиды встраивались в центр молекулы, между субъединицами трФНО α . В 21 % наблюдений взаимодействие олигопептидов с трФНО α происходило на боковых поверхностях молекулы. При этом данная локация являлась дополнительной. Таким образом, встраивание олигопептида между субъединицами в молекуле трФНО α является термодинамически более выгодной локацией.

Для локусов взаимодействия олигопептидов с мФНО α характерно большее разнообразие. Для более точного описания локаций олигопептидов с поверхностью молекулы мФНО α ее молекула



Деление молекулы мФНО α на квадранты для описания локуса взаимодействия с олигопептидами

The mFNO α molecule division into quadrants to describe the interaction locus

была разделена на квадранты (см. рисунок). В 59 % наблюдений олигопептиды располагались на поверхности мФНО α во втором квадранте, в 50 % – в первом, в 33 % – в третьем, в 21 % – в четвертом квадранте. Таким образом, верхняя часть молекулы мФНО α (первый и второй квадрант) является более энергетически выгодной для взаимодействия с олигопептидами.

Для экспериментов *in vitro* отобраны олигопептиды с наибольшей энергией связывания как с мФНО α , так и с трФНО α . Обнаружены волнообразные изменения константы связывания при изменении концентрации цитокина в среде. При минимальной концентрации ФНО α ($0,0287 \cdot 10^{-8}$ $\mu\text{моль}$) все три олигопептида взаимодействуют с цитокином, имеющим коэффициент связывания более $0,9 \cdot 10^{-8}$ $\mu\text{моль}$. Далее, по мере увеличения концентрации ФНО α , константа связывания снижалась. Статистически значимые различия в константе связывания наблюдали при высоких концентрациях цитокина в среде ($0,575 \cdot 10^{-8}$ и $1,437 \cdot 10^{-8}$ $\mu\text{моль}$).

На основании анализа полученных результатов можно заключить, что олигопептид WNW является более эффективным, так как характеризуется наилучшей свободной энергией связывания ($-7,25$ [6,70–7,70] ккал/моль) и высокой, по сравнению с другими олигопептидами, константой связывания – $K_{\text{св}} = 0,1809$ [0,1809–0,1858] $\mu\text{моль}^{-1}$ (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Характеристика эффективности связывания синтетических олигопептидов ФНО α

Table 3. Characteristics of the binding efficiency of synthetic oligopeptides with TNF α

Лиганд	Рецептор	Константа связывания <i>in vitro</i> , $\mu\text{моль}^{-1}$	Св. энергия связывания мФНО α <i>in silico</i> , – ккал/моль	Св. энергия связывания трФНО α <i>in silico</i> , – ккал/моль
WVP	ФНО α	0,0772 [0,0758–0,0800]	5,60 [5,35–5,80]	7,30 [7,10–8,20]
WNWV		0,0807 [0,0786–0,0835]	6,75 [6,60–6,85]	7,20 [7,10–7,50]
WNW		0,1809 [0,1809–0,1858]*	6,50 [6,40–6,62]*	7,25 [6,75–7,70]

П р и м е ч а н и е. * – результаты достоверны ($p \leq 0,05$).

Заключение. Таким образом, на основании полученных с помощью молекулярного докинга данных можно сделать следующие выводы: 1) энергия взаимодействия олигопептидов с трФНО α не зависит от количества аминокислотных остатков в олигопептиде; 2) тримеризованная форма ФНО α более эффективно взаимодействует с олигопептидами по сравнению с мФНО α ; 3) олигопептиды, содержащие аминокислотный остаток -Trp- и являющиеся пространственным аналогом фрагмента ФНО α -R2 (-Trp⁶⁵-Asn⁶⁶-Trp⁶⁷-Val⁶⁸-Pro⁶⁹-) эффективнее взаимодействуют с молекулой ФНО α ; 4) отобранные олигопептиды (Trp-Asn-Trp, Trp-Val-Pro, Trp-Asn-Trp-Val) наиболее перспективны для связывания ФНО α . Результаты экспериментов *in vitro* подтвердили эффективность только одного (Trp-Asn-Trp) из трех олигопептидов.

Список использованных источников

1. Aggarwal, B. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey / B. Aggarwal, S. Gupta, J. Kim // *Blood*. – 2012. – Vol. 119, N 3. – P. 651–665. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-325225>
2. Steeland, S. A new venue of TNF targeting / S. Steeland, C. Libert, R. E. Vandenbroucke // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, N 5. – P. 1–55. <https://doi.org/10.3390/ijms19051442>
3. Idriss, H. T. TNF α and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s) / H. T. Idriss, J. H. Naismith // *Microscopy Res. Technique*. – 2000. – Vol. 50, N 3. – P. 184–195. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000801\)50:3<184::aid-jemt2>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::aid-jemt2>3.0.co;2-h)
4. Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex / Y. Mukai [et al.] // *Sci. Sign.* – 2010. – Vol. 3, iss.148. – P. 1–10. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000954>
5. Smith, R. The active form of tumor necrosis factor is a trimer / R. Smith, C. Baglioni // *J. Biol. Chem.* – 1987. – Vol. 262, N 15. – P. 6951–6954. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48183-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48183-5)
6. Faustman, D. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases / D. Faustman, M. Davis // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2010. – Vol. 9, N 6. – P. 482–493. <https://doi.org/10.1038/nrd3030>
7. The key role of TNF-TNFR2 Interactions in the modulation of allergic inflammation: a review / S. Ahmad [et al.] // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – Art. 2572. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02572>
8. Cytokine induction of tumor necrosis factor receptor 2 is mediated by STAT3 in colon cancer cells / K. E. Hamilton [et al.] // *Mol. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 9, N 12. – P. 1718–1731. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-10-0210>

9. Sheng, Y. Makes tumor necrosis factor a friend of tumors / Y. Sheng, F. Li, Z. Qin // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – Art. 1170. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01170>
10. Anti-TNF- α therapies: the next generation / M. A. Palladion [et al.] // *Nat. Rev.* – 2003. – Vol. 2, N 9. – P. 736–744. <https://doi.org/10.1038/nrd1175>
11. Desai, S. Problems encountered during anti-tumour necrosis factor therapy / S. Desai, D. E. Furst // *Best Practice Res. Clin. Rheumatol.* – 2006. – Vol. 20, N 4. – P. 757–790. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2006.06.002>
12. Sharma, R. TNF-alpha inhibitors: current indications / R. Sharma, C. L. Sharma // *Indian J. Crit. Care Med.* – 2007. – Vol. 11, N 3. – P. 139–148. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.35087>
13. Aptamers against pro- and anti-inflammatory cytokines: a review / M. Boshtam [et al.] // *Inflammation.* – 2016. – Vol. 40, N 1. – P. 340–349. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0477-1>
14. Fosgerau, K. Peptide therapeutics: current status and future directions / K. Fosgerau, T. Hoffmann // *Drug Discovery Today.* – 2015. – Vol. 20, N 1. – P. 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>
15. A potential peptide derived from cytokine receptors can bind proinflammatory cytokines as a therapeutic strategy for antiinflammation / S.-J. Jiang [et al.] // *Sci. Reports.* – 2019. – Vol. 9. – Art. 2317. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-36492-z>
16. Zoete, V. Docking, virtual high through put screening and in silico fragment-based drug design / V. Zoete, A. Grosdidier, O. J. Michielin // *J. Cell. Mol. Med.* – 2009. – Vol. 13, N 2. – P. 238–248. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00665.x>
17. Discovery of novel ligands for TNF- α and TNF receptor-1 through structure-based virtual screening and biological assay / S. Chen [et al.] // *J. Chem. Inf. Model.* – 2017. – Vol. 57, N 5. – P. 1101–1111. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00672>
18. Identification of potential TNF- α inhibitors: from in silico to *in vitro* studies / K. Zia [et al.] // *Sci. Reports.* – 2020. – Vol. 10. – Art. 20974. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77750-3>
19. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility / G. M. Morris [et al.] // *J. Comp. Chem.* – 2009. – Vol. 30, N 16. – P. 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
20. Гуреев, М. А. Молекулярный докинг и его верификация в контексте виртуального скрининга / М. А. Гуреев, В. В. Кадочников, Ю. Б. Порозов. – СПб. : УН-Т ИТМО, 2018 – 50 с.

References

1. Aggarwal B., Gupta S., Kim J. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 3, pp. 651–665. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-325225>
2. Steeland S., Libert C., Vandenbroucke R. E. A new venue of TNF targeting. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, vol. 19, no. 5, pp. 1–55. <https://doi.org/10.3390/ijms19051442>
3. Idriss H. T., Naismith J. H. TNF α and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique*, 2000, vol. 50, no. 3, pp. 184–195. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000801\)50:3<184::aid-jemt2>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::aid-jemt2>3.0.co;2-h)
4. Mukai Y., Nakamura T., Yoshikawa M., Yoshioka Y., Tsunoda S.-I., Nakagawa S., Yamagata Y., Tsutsumi Y. Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. *Science Signaling*, 2010, vol. 3, iss. 148, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000954>
5. Smith R., Baglioni C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, vol. 262, no. 15, pp. 6951–6954. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48183-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48183-5)
6. Faustman D., Davis M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, vol. 9, no. 6, pp. 482–493. <https://doi.org/10.1038/nrd3030>
7. Ahmad S., Azid N. A., Boer J. C., Lim J., Chen X., Plebanski M., Mohamud R. The key role of TNF-TNFR2 interactions in the modulation of allergic inflammation: a review. *Frontiers in Immunology*, 2018, vol. 9, art. 2572. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02572>
8. Hamilton K. E., Simmons J. G., Ding S., van Landeghem L., Lund P. K. Cytokine induction of tumor necrosis factor receptor 2 is mediated by STAT3 in colon cancer cells. *Molecular Cancer Research*, 2011, vol. 9, no. 12, pp. 1718–1731. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-10-0210>
9. Sheng Y., Li F., Qin Z. Makes tumor necrosis factor a friend of tumors. *Frontiers in Immunology*, 2018, vol. 9, art. 1170. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01170>
10. Palladino M. A., Bahjat F. R., Teodorakis E. A., Moldawer L. L. Anti-TNF- α therapies: the next generation. *Nature Reviews*, 2003, vol. 2, no. 9, pp. 736–744. <https://doi.org/10.1038/nrd1175>
11. Desai S., Furst D. E. Problems encountered during anti-tumor necrosis factor therapy. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*, 2006, vol. 20, no. 4, pp. 757–790. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2006.06.002>
12. Sharma R., Sharma C. L. TNF-alpha inhibitors: current indications. *Journal of Critical Care Medicine*, 2007, vol. 11, no. 3, pp. 139–148. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.35087>
13. Boshtam M., Asgary S., Kouhpayeh S., Shariati L., Khanahmad H. Aptamers against pro- and anti-inflammatory cytokines: a review. *Inflammation*, 2016, vol. 40, no. 1, pp. 340–349. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0477-1>
14. Fosgerau K., Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*, 2015, vol. 20, no. 1, pp. 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>
15. Jiang S.-J., Tsai P.-I., Peng S.-Y., Chang C.-C., Chung Y., Tsao H.-H., Huang H.-T., Chen S.-Y., Hsu H.-J. A potential peptide derived from cytokine receptors can bind proinflammatory cytokines as a therapeutic strategy for antiinflammation. *Scientific Reports*, 2019, vol. 9, art. 2317. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36492-z>

16. Zoete V., Grosdidier A., Michielin O. J. Docking, virtual high through put screening and in silico fragment-based drug design. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2009, vol. 13, no. 2, pp. 238–248. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00665.x>

17. Chen S., Feng Z., Wang Y., Ma S., Hu Z., Yang P., Chai Y., Xie X. Discovery of novel ligands for TNF- α and TNF Receptor-1 through structure-based virtual screening and biological assay. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2017, vol. 57, no. 5, pp. 1101–1111. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00672>

18. Zia K., Ashraf S., Jabeen A., Saeed M., Nur-e-Alam M., Ahmed S., Al-Rehaily A. J., Ul-Haq Z. Identification of potential TNF- α inhibitors: from in silico to in vitro studies. *Scientific Reports*, 2020, vol. 10, art. 20974. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77750-3>

19. Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S., Olson A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 2009, vol. 30, no. 16, pp. 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>

20. Gureev M. A., Kadochnikov V. V., Porosov Yu. B. *Molecular docking and its verification in the context of virtual screening*. St. Petersburg, Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, 2018. 50 p. (in Russian).

Информация об авторах

Рябцева Татьяна Владимировна – науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ta-yana@yandex.ru

Макаревич Денис Александрович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: demkarevich@yandex.ru

Таганович Анатолий Дмитриевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: 83taganovich@bsmu.by

Information about the authors

Tatiana V. Ryabtseva – Researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ta-yana@yandex.ru

Denis A. Makarevich – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: demkarevich@yandex.ru

Anatoliy D. Taganovich – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: 83taganovich@bsmu.by