

УДК 577.29

**IN SILICO-АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ SMAD4 С R-SMAD: СРАВНИТЕЛЬНОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ В НОРМЕ И ПРИ ОНКОГЕННЫХ МУТАЦИЯХ**

Е.В. Гаврилов, 2 курс

Научный руководитель – **И.С. Черней**, ассистент кафедры биохимии и биоинформатики.
Полесский государственный университет

SMAD – это группа белков, основная функция которых заключается в передаче внеклеточных сигналов непосредственно в ядро клетки. Эту группу белков можно разделить на три категории: R-SMAD (SMAD1, 2, 3, 5, 8), Co-SMAD (SMAD4), I-SMAD (SMAD6, 7).

Белок SMAD4 является центральным звеном в сигнальном пути TGF- β . Рецепторы факторов TGF- β являются трансмембранными серин-треониновыми протеинкиназами. Димерный фактор TGF- β связываются с трансмембранным рецептом TGF- β типа 2 (TGFB2) активируя его. Активированный TGFB2 рекрутирует рецептор TGF- β типа 1 (TGFB1) образуя с ним гетеротетрамёрный комплекс. При этом TGFB2 фосфорилирует TGFB1. Далее неактивные формы белков R-SMAD (SMAD2/3) рекрутируются к TGFB1, который фосфорилирует их по консервативному С-концевому участку, богатому серином. Активированные R-SMAD связываются с SMAD4, образуя гетеротримёрный комплекс, который затем транслоцируется в ядро клетки, где они связываются непосредственно с SBE и рекуррентными факторами для транскрипции или подавления целевых генов [1].

Эффекты сигнального пути TGF- β /SMAD сильно зависят от контекста и типа клеток. Члены TGF- β -семейства регулируют такие клеточные процессы как дифференцировку, пролиферацию, миграцию и апоптоз. В связи с таким широким набором функций, нарушения в функционировании сигнального пути TGF- β часто ассоциируют с канцерогенезом. Так как именно SMAD4 является единственным Co-SMAD и центральным звеном этого пути, то его мутации наиболее значимыми в развитии рака. SMAD4 связывают с такими видами рака как протоковая аденокарцинома поджелудочной железы, колоректальным раком, холангиокарциномой, раком желудка, предстательной железы и другими [1]. При протоковой аденокарциноме поджелудочной железы инактивация SMAD4 коррелирует с более низкой выживаемостью у пациентов с удалённой опухолью [2].

SMAD имеет доменную конфигурацию, где можно выделить MH1-домен, необходимый для взаимодействия с ДНК, MH2-домен, который нужен для образования комплексов с R-SMAD, и, связывающий их, линкерный участок. Активность MH2 регулирует функциональный домен SAD. Их объединяют вместе в транскрипционно активный фрагмент SMAD4 (S4AF) [3]. Мутации в домене MH2 происходят значительно чаще, чем в MH1 и линкерном участке. Потому принято считать MH2 «горячей точкой» мутаций SMAD4 [4]. И так как этот домен отвечает за регуляцию транскрипции, связываясь с R-SMAD, то мутации в нём могут приводить к нарушению его транскрипционной активностью и, потенциально, выключить весь путь TGF- β , что может повышать риска развития канцерогенеза.

Целью этой работы является оценка влияния некоторых онкогенных миссенс-мутаций на характер связывания SMAD4 с белками R-SMAD при помощи методов *in silico*.

Для исследования была взята модель S4AF, полученная методом молекулярного замещения [3]. Для оценки были выбраны мутации Y353C, K507Q и R515G. Влияние этих мутаций на работу SMAD4 были выявлены экспериментально [5, 6].

Для оценки влияния мутаций на конформационные изменения в структуре белка использовался онлайн-инструмент – Missense 3D. Он показал значимые структурные изменения только при мутации Y353C [7].

Для создания мутантных форм белка SMAD4 (S4AF) использовалась UCSF ChimeraX. После замены аминокислотных остатков была проведена минимизация структуры белка, в т.ч. и для белка дикого типа (WT) [8].

Белок-белковый докинг проводился с гомодимером SMAD2 при помощи веб-сервера HDock. В качестве итоговых были выбраны модели, имеющие наименьшее значение Docking Score и наибольшее значение Confidence Score [9, 10].

Для расчёта изменения энергии Гиббса и других показателей комплекса SMAD4 (субъединица В) с SMAD2 (субъединицы А и С) был использован интерактивный инструмент PDBePISA [11].

По итогам оценки сродства связывания, у мутантов Y353C и R515G, по сравнению с белком SMAD4-WT, уменьшилось значение ΔiG к субъединице А ($P < 0.5$). По отношению к субъединице С значение ΔiG увеличилось. При мутации K507Q значение ΔiG для субъединицы А немного возросло, а для субъединицы С возросло незначительно. Площадь поверхности раздела возросла при всех мутациях. Во всех случаях, значение P для субъединицы С было > 0.5 , что означает возможность получения более низких значений ΔiG . Данные по оценке сродства внесены в таблицу.

Таблица – Результаты оценки сродства связывания SMAD2 с различными формами SMAD4

Субъединицы	Площадь поверхности раздела (Å ²)	ΔiG (ккал/моль)	P-значение для ΔiG
SMAD2 – SMAD4-WT			
A-C	1204.0	-10.0	0.214
A-B	991.1	-10.5	0.393
C-B	948.8	-6.2	0.679
SMAD2 – SMAD4-Y353C			
A-C	1204.0	-10.0	0.214
A-B	1056.4	-13.2	0.317
C-B	976.2	-3.1	0.823
SMAD2 – SMAD4-K507Q			
A-C	1204.0	-10.0	0.214
A-B	1045.5	-10.0	0.466
C-B	955.2	-6.3	0.688
SMAD2 – SMAD4-R515G			
A-C	1204.0	-10.0	0.214
A-B	1021.8	-12.1	0.324
C-B	990.1	-4.3	0.804

Основываясь на полученных данных, можно сделать вывод, что на работу белка серьезно могут повлиять миссенс-мутации, в результате которых не происходит значительных конформационных перестроек. При этом важно учитывать не просто общее сродство димера R-SMAD к SMAD4, а отдельное влияние каждой из субъединиц и характер их взаимодействия.

Список использованных источников

1. Zhao M., Mishra L., Deng C. X. The role of TGF-β/SMAD4 signaling in cancer // International Journal of Biological Sciences. 2018. Vol. 14, № 2. P. 111–123. DOI: 10.7150/ijbs.23230.
2. Blackford A., Serrano O. K., Wolfgang C. L. et al. SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer // Clinical Cancer Research. 2009. Vol. 15, № 14. P. 4674–4679. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0227.
3. Qin B., Lam S. S., Lin K. Crystal structure of a transcriptionally active Smad4 fragment // Structure. 1999. Vol. 7, № 12. P. 1493–1503. DOI: 10.1016/s0969-2126(00)88340-9.
4. Wan R., Feng J., Tang L. Consequences of Mutations and Abnormal Expression of SMAD4 in Tumors and T Cells // OncoTargets and Therapy. 2021. Vol. 14. P. 2531–2540. DOI: 10.2147/OTT.S297855.
5. Kuang C., Chen Y. Tumor-derived C-terminal mutations of Smad4 with decreased DNA binding activity and enhanced intramolecular interaction // Oncogene. 2004. Vol. 23, № 5. P. 1021–1029. DOI: 10.1038/sj.onc.1207219.
6. Wang Z., Li Y., Zhan S. et al. SMAD4 Y353C promotes the progression of PDAC // BMC Cancer. 2019. Vol. 19, № 1. Article 1037. DOI: 10.1186/s12885-019-6251-7.
7. Ittisoponpisan S., Islam S. A., Khanna T. et al. Can Predicted Protein 3D Structures Provide Reliable Insights into whether Missense Variants Are Disease Associated? // Journal of Molecular Biology. 2019. Vol. 431, № 11. P. 2197–2212. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.04.009.
8. Meng E. C., Goddard T. D., Pettersen E. F. et al. UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis // Protein Science. 2023. Vol. 32, № 11. Article e4792.
9. Chacko B. M., Qin B. Y., Tiwari A. et al. Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling // Molecular Cell. 2004. Vol. 15, № 5. P. 813–823. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.07.016.
10. Yan Y., Zhang D., Zhou P., Li B., Huang S.-Y. HDock: a web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy // Nucleic Acids Research. 2017. Vol. 45, № W1. P. W365–W373.

11. Krissinel E., Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state // Journal of Molecular Biology. 2007. Vol. 372, № 3. P. 774–797. (Сервис «Protein interfaces, surfaces and assemblies» PISA).

УДК 579:340.6

АНАЛИЗ МИКРОБИОТЫ ОБЪЕКТОВ, КОНТАКТИРУЮЩИХ С КОЖЕЙ ЧЕЛОВЕКА, В СУДЕБНО-БИОЛОГИЧЕСКОМ АСПЕКТЕ

Е.А. Гаврилюк, 4 курс

Научный руководитель – **Я.С. Камельчук**, старший преподаватель

Полесский государственный университет

В исследовании проведена сравнительная микробиологическая оценка объектов, контактирующих с кожей человека (одежда и предметы повседневного использования). Установлено, что в среднем наибольшая микробная обсеменённость характерна для фрагмента одежды (16000 КОЕ/см²), тогда как среди предметов наибольшие значения выявлены для телефона (1240 КОЕ/см²) и кошелька (1040 КОЕ/см²). Морфологический анализ колоний показал преобладание типичных представителей кожной микрофлоры. Полученные данные подтверждают информативность микробиологических показателей для оценки степени контаминации объектов и их возможного использования в судебно-биологических исследованиях.

Микробиологический анализ объектов, контактирующих с телом человека, представляет собой перспективное направление судебно-биологических исследований [1]. Кожа человека является сложной экосистемой, заселённой разнообразными микроорганизмами, которые способны переноситься на окружающие предметы и сохраняться на их поверхности в течение длительного времени [2]. Формирование индивидуального микробного профиля создаёт предпосылки для использования микробиологических следов в задачах идентификации и реконструкции контактов [3]. В этом контексте особый интерес представляет количественная и качественная оценка микрофлоры на различных объектах, регулярно взаимодействующих с кожей. Несмотря на развитие методов молекулярной диагностики, традиционные микробиологические подходы, основанные на определении общего микробного числа и анализе культуральных признаков, остаются информативными и доступными [4].

Целью исследования являлось проведение микробиологической оценки объектов, контактирующих с кожей человека, и определение их информативности как носителей биологических следов.

Объектами исследования являлись поверхности, контактирующие с кожей человека: № 1 - фрагмент лабораторного халата (подмышечная область), № 2 - экран мобильного телефона, № 3 - обложка книги, № 4 - поверхность кошелька, № 5 - обложка тетради и № 6 - носочная часть кроссовка.

Отбор проб проводили методом смыва стерильным тампоном, смоченным физиологическим раствором, с фиксированной площади поверхности. Полученные суспензии подвергали серийным десятикратным разведениям (до 10⁻³) [5]. Посев осуществляли поверхностным методом на чашки Петри с универсальной питательной средой ГРМ. Инкубацию проводили при температуре 37 °С в течение 24 часов. После инкубации осуществляли подсчёт колониеобразующих единиц (КОЕ) с последующим расчётом общего микробного числа по формуле с учётом разведения, объёма исходной суспензии и площади отбора [6]. Одновременно проводили морфологический анализ колоний с оценкой их формы, размера, цвета, поверхности и консистенции [2].

Статистическую обработку проводили с расчётом среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm \sigma$) [4].

Анализ полученных данных показал значительные различия в степени микробной обсеменённости исследуемых объектов. В среднем максимальное значение общего микробного числа зафиксировано на фрагменте лабораторного халата (16000 КОЕ/см²), что обусловлено длительным контактом с кожей, повышенной влажностью и наличием питательных субстратов.

Среди предметов повседневного использования наибольшая контаминация выявлена на поверхности телефона (1240 КОЕ/см²) и кошелька (1040 КОЕ/см²), что связано с частым контактом с руками и внешней средой. Минимальные значения зарегистрированы для обложек книги и тетра-