

## **Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A<sub>165</sub>): ассоциация с заболеваниями, моделирование структуры и сравнение с экспериментальными данными**

Немашкалова Е.Л., Шевелёва М.П., Дерюшева Е.И.

*Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» г. Пушкино*

[elnemashkalova@gmail.com](mailto:elnemashkalova@gmail.com), [evgenia.deryusheva@gmail.com](mailto:evgenia.deryusheva@gmail.com)

Изоформа А фактора роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF-A<sub>165</sub>) – сигнальный белок, играющий наиболее важную роль в организме человека среди других факторов роста. VEGF-A<sub>165</sub> вырабатывается клетками для стимулирования роста новых сосудов. Актуальность исследования свойств VEGF-A<sub>165</sub> обусловлена его прогностической важностью при развитии различных заболеваний, а также эффективностью антиангиогенной терапии при лечении некоторых видов рака, тромбоза, ретинопатии и макулодистрофии и перспективностью применения терапевтических индукторов ангиогенеза. Поиск заболеваний, ассоциированных с VEGF-A<sub>165</sub>, по базам DisGeNET и Open Targets Platform позволил нам выявить наиболее значимые из них. Поскольку VEGF-A<sub>165</sub> относится к белкам с большой долей внутренней неупорядоченности, на сегодняшний день отсутствует кристаллическая структура полноразмерного белка, а существующие работы посвящены исследованию его отдельных частей. В данной работе нами предложена трехмерная модель полноразмерного белка VEGF-A<sub>165</sub> (гомодимера). Рассчитанные по модели значения содержания элементов вторичной структуры и параметры белковой структуры согласуются с экспериментальными данными. Полученные результаты позволят в дальнейшем проводить экспериментальные и теоретические исследования взаимодействия VEGF-A<sub>165</sub> с его природными лигандами и терапевтическими антителами.

*Ключевые слова: человеческий фактор роста эндотелия сосудов, моделирование.*

## **Vascular endothelial growth factor (VEGF-A<sub>165</sub>): association with diseases, structure modelling and comparison with the experimental data**

Nemashkalova E.L., Shevelyova M. P., Deryusheva E.I.

*Institute for Biological Instrumentation, Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino*

Vascular endothelial growth factor isoform (VEGF-A<sub>165</sub>) is a signaling protein that plays the most important role in the human body among other growth factors. VEGF-A<sub>165</sub> is produced by cells to stimulate the growth of new blood vessels. The relevance of studying the properties of VEGF-A<sub>165</sub> is due to its prognostic importance in the development of various diseases, and to the effectiveness of antiangiogenic therapy in the treatment of certain types of cancer, thrombosis, retinopathy, and macular degeneration, as well as the prospects for the use of therapeutic angiogenesis inducers. The search for diseases associated with VEGF-A<sub>165</sub> in the DisGeNET and Open Targets Platform databases allowed us to identify the most significant of them. Since VEGF-A<sub>165</sub> belongs to proteins with a high degree of internal disorder, there is no crystal structure of a full-sized protein to date; existing experimental works are devoted to the study of its individual parts. In this work, we have proposed a three-dimensional model of the full-length VEGF-A<sub>165</sub> protein (homodimer). The content of secondary structure elements calculated by the model and the parameters of the protein structure are consistent with the experimental data. The data obtained will allow further experimental and theoretical studies of the interaction of VEGF-A<sub>165</sub> with its natural ligands and therapeutic antibodies.

*Key words: human vascular endothelial growth factor, modelling.*

## 1. Введение

Фактор роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF-A<sub>165</sub>) представляет собой высококонсервативный секретируемый сигнальный белок, играющий ключевую роль в процессе ангиогенеза [1]. VEGF взаимодействует с рецепторами VEGFR1 и VEGFR2, экспрессирующимися во многих типах несосудистых клеток, а также при различных видах рака [2, 3]. Помимо связывания секретируемого VEGF-A<sub>165</sub> со своими рецепторами во внеклеточном пространстве на клеточной мембране, белок, локализованный внутри клетки, является важной сигнальной молекулой, регулирующей рост, выживание и метаболизм клеток [4].

В структуре VEGF-A<sub>165</sub> выделяют рецептор-связывающий домен (около 100 а.о., receptor binding domain, RBD) и гепарин-связывающий домен (около 50 а.о., heparin binding domain, HBD) [5, 6]. На сегодняшний день отсутствует кристаллическая структура полноразмерного белка (включающая как RBD, так и HBD) вследствие большой доли неупорядоченных областей внутри доменов, а также связывающего их линкера высокой гибкости.

В данной работе нами предложена трехмерная модель полноразмерного белка VEGF-A<sub>165</sub> (гомодимера); проведено сравнение параметров модели с экспериментальными данными. Кроме того, был проведен поиск ассоциации VEGF-A<sub>165</sub> с различными заболеваниями человека (DisGeNET, Open Targets Platform): выделены наиболее значимые (с высокой степенью ассоциации, association score) заболевания, связанные с дисрегуляцией VEGF-A<sub>165</sub>.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Материалы

Коммерческий препарат рекомбинантного человеческого VEGF-A<sub>165</sub> (SCI-store, Россия).

### 2.2. Ассоциация VEGF-A<sub>165</sub> с заболеваниями

Поиск заболеваний, ассоциированных с VEGF-A<sub>165</sub> (UniProt ID P15692-4), был осуществлен по базам данных болезней человека DisGeNET v7.0 [7] и Open Targets Platform v.22.02 [8] как описано в [9].

### 2.3. Последовательность и структурная организация фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A<sub>165</sub>)

Аминокислотная последовательность VEGF-A<sub>165</sub> доступна по номеру UniProt ID P15692-4. Известны трехмерные структуры отдельных частей VEGF-A<sub>165</sub> (~ 130 а.о.) в комплексе с VEGFR1, VEGFR2 (PDB ID 5T89; 3V2A; 2VPF; 1VGH). Структурная классификация доменов VEGF-A<sub>165</sub> проведена

согласно базе данных SCOP [10]. Процент внутренней неупорядоченности VEGF-A<sub>165</sub> был рассчитан с использованием программы PONDR [11].

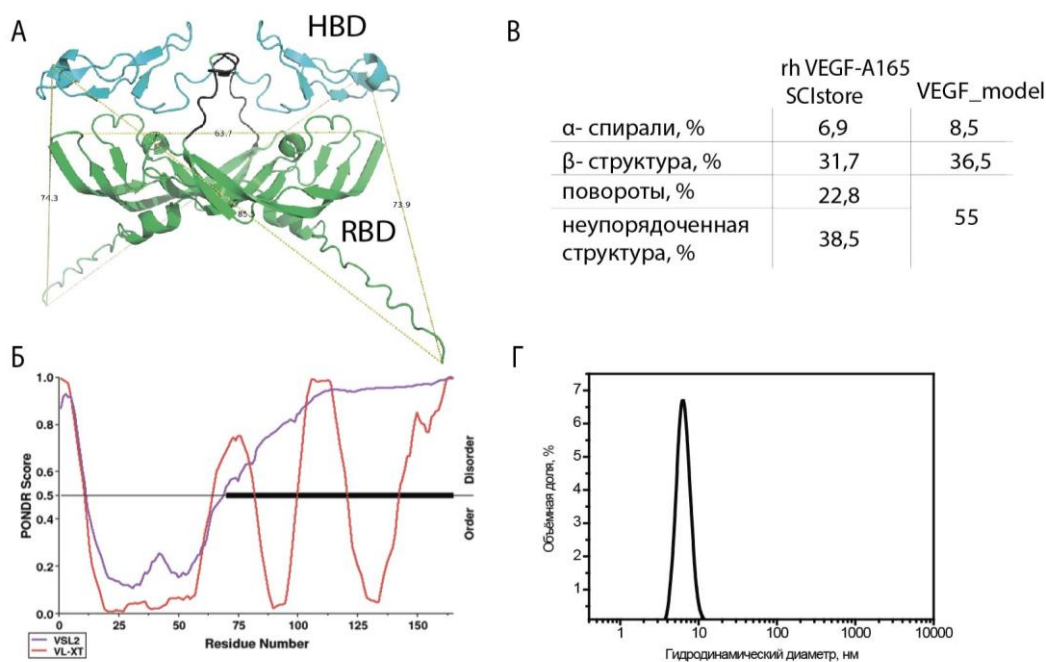
### 2.4. Моделирование структуры VEGF-A<sub>165</sub>

В качестве основы для моделирования были взяты трехмерные структуры доменов RBD и HBD: 2VPF и 1VGH, соответственно. Гомодимерная форма белка VEGF-A<sub>165</sub> была предсказана сервером AlphaFold [12]. Сервером I-TASSER [13] были предсказаны мономерные субъединицы VEGF-A<sub>165</sub> (HBD, linker, HBD). Выравнивание, уточнение и визуализация трехмерных структур осуществлялись с помощью PyMOL v.2.5.0 [14], онлайн сервиса Pairwise Structure Alignment RCSB PDB [15] и сервера Stride [16]. Расчет содержания элементов вторичной структуры в модели VEGF-A<sub>165</sub>, а также измерение линейных параметров проводились с помощью скриптов в PyMOL v.2.5.0.

### 2.5. Исследование вторичной и четвертичной структуры VEGF-A<sub>165</sub>

Измерение спектров кругового дихроизма (КД) в дальней ультрафиолетовой (УФ) области проводили на спектрополяриметре J-810, оснащенный Пельтье-контролируемым кюветодержателем. Сканирование проводилось при температуре 25°C в пошаговом режиме в диапазоне длин волн 195–250 нм. Концентрация белка составляла 1.5 мМ. Из спектра белка вычитали сглаженный спектр КД буфера. Для количественной оценки содержания элементов вторичной структуры использовали пакет программного обеспечения CDPPro [17]. Экспериментальные данные анализировали в диапазоне длин волн 200–240 нм с помощью алгоритмов CDSSTR, SELCON3 и CONTIN, используя наборы референтных спектров SDP48 и SMP56. Полученные оценки содержания элементов вторичной структуры в белке усредняли.

Изучение четвертичной структуры белка проводили методом динамического светорассеяния (ДРС). Кювету из полистирола (длина оптического пути 1 см) с 200 мкл раствора препарата VEGF-A<sub>165</sub> в буфере термостатировали при 25 °C в течение 180 сек с последующей записью кинетики сигнала флуктуации интенсивности светорассеяния. Построение автокорреляционной функции, нахождение характеристического времени релаксации  $\tau_c$  и вычисление соответствующего коэффициента диффузии  $D$  белка, вычисление гидродинамического диаметра  $d$  по уравнению Стокса-Эйнштейна в приближении сферических частиц проводили с использованием программного обеспечения Malvern Software.



**Рис. 1.** (А). Модель VEGF-A<sub>165</sub> (линейные размеры приведены в Å). (Б). Профили PONDR внутренней неупорядоченности VEGF-A<sub>165</sub> (версии VLXT и VSL2). (В). Содержание элементов вторичной структуры в препаратах VEGF-A (SCI store) по данным метода КД и рассчитанные по модели. (Г). Объемная доля частиц как функция гидродинамического диаметра для раствора VEGF-A<sub>165</sub>.

### 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1. Ассоциация VEGF-A<sub>165</sub> с заболеваниями

Поиск заболеваний, ассоциированных с VEGF-A<sub>165</sub> (ген VEGFA), в базе данных DisGeNET выявил 1899 записей, шесть из которых (злокачественная опухоль толстой кишки, псориаз, окклюзия вен сетчатки, портальная гипертензия, сахарный диабет, хориоидальная неоваскуляризация) можно рассматривать как наиболее значимые (association score  $\geq 0.5$ ). Аналогичный поиск по Open Targets Platform дает 2249 заболеваний, ассоциированных с VEGF-A<sub>165</sub>, 26 из которых имеют степень ассоциации  $\geq 0.5$ . Среди них возрастная макулярная дегенерация, диабетическая ретинопатия, макулодистрофия, диабетический макулярный отек, колоректальная карцинома, пролиферативная диабетическая ретинопатия и рак молочной железы имеют степень ассоциации с дисрегуляцией VEGF-A<sub>165</sub> больше 0.6.

#### 3.2. Структурная организация VEGF-A<sub>165</sub>

Структура VEGF-A<sub>165</sub> состоит из двух структурных доменов: рецептор-связывающий домен (RBD) и гепарин-связывающий домен (HBD) (SCOP ID 8026369 и 8026577, соответственно) (Рисунок 1А).

Программа PONDR предсказывает процент внутренней неупорядоченности от 42 до 64 % (версии VLXT и VSL2, соответственно) (Рисунок 1Б). При этом профиль PONDR версии VLXT выявляет характерный развернутый N-конец VEGF-A<sub>165</sub>, гибкий линкер в районе 100–120 а.о., а также

развернутую С-концевую область (со 135 а.о.), соответствующую HBD. Версия VSL2 предсказывает полностью развернутую область VEGF-A<sub>165</sub> с 70 а.о..

Моделирование полноразмерного белка VEGF-A<sub>165</sub> (гомодимера) было проведено на основе известной кристаллографической структуры RBD домена VEGF-A<sub>165</sub> (PDB 2VPF), HBD домена VEGF-A<sub>165</sub> (PDB 1VGH), а также предсказанных сервером I-TASSER мономерных субъединиц VEGF-A<sub>165</sub> (HBD, linker, HBD) и структуры полноразмерного димера VEGF-A<sub>165</sub>, предсказанной программой AlphaFold2 в режиме мультимера. Структуры были выравнены и уточнены с помощью Pairwise Structure Alignment RCSB. Расчет содержания вторичной структуры в конечной модели VEGF-A<sub>165</sub>, а также линейные параметры полученной модели приведены на рисунке 1(А, В).

#### 3.3. Сравнение параметров модели с экспериментальными данными

Анализ полученных спектров КД пакетом программного обеспечения CDPPro позволил рассчитать содержания элементов вторичной структуры препарата белка. Исследованный препарат VEGF-A<sub>165</sub> характеризуется преобладанием неупорядоченной (38.5 %) и β-складчатой (31.7 %) структуры, что согласуется с литературными данными для данного белка [5] (рис. 1В).

Расчет долей элементов вторичной структуры из модели полноразмерного VEGF-A<sub>165</sub>, а также процент внутренней неупорядоченности,

рассчитанной программой PONDR, дает значения, близкие к экспериментальным. Для препарата VEGF-A<sub>165</sub> основной пик светорассеяния соответствует частицам диаметром  $6.5 \pm 1.3$  нм (рис. 1Г), что также соответствует линейным параметрам модели.

#### 4. Заключение

Таким образом, нами была предложена трехмерная структура полноразмерного белка VEGF-A<sub>165</sub> (гомодимера) и проведено сравнение параметров модели с экспериментальными данными (КД, ДРС). В структуре выявлены гепарин-связывающий домен (разупорядоченный) и тромбоцитарный домен. Полученную модель предполагается в дальнейшем использовать в качестве основы для исследований взаимодействия VEGF-A<sub>165</sub> с его природными лигандами (например, гепарином) и терапевтическими антителами, а также для обоснования полученных экспериментальных данных.

#### 5. Благодарности

Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ № 22-24-00083 (Е.И. Дерюшева).

#### 6. Список литературы

1. Holmes D.I., Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol.* 2005. V. 6. doi: [10.1186/gb-2005-6-2-209](https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-2-209)
2. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 2004. V. 25. P. 581–611. doi: [10.1210/er.2003-0027](https://doi.org/10.1210/er.2003-0027)
3. Ntellas P., Mavroeidis L., Gkoura S., Gazouli I., Amylidi A.L., *et al.* Old Player-New Tricks: Non Angiogenic Effects of the VEGF/VEGFR Pathway in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. doi: [10.3390/cancers12113145](https://doi.org/10.3390/cancers12113145)
4. Wiszniak S., Schwarz Q. Exploring the Intracrine Functions of VEGF-A. *Biomolecules*. 2021. V. 11. doi: [10.3390/biom11010128](https://doi.org/10.3390/biom11010128)
5. Wijelath E., Namekata M., Murray J., Furuyashiki M., Zhang S., Coan D., Wakao M., Harris R.B., Suda Y., Wang L., Sobel M. Multiple mechanisms for exogenous heparin modulation of vascular endothelial growth factor activity. *J. Cell Biochem.* 2010. V. 111. P. 461–468. doi: [10.1002/jcb.22727](https://doi.org/10.1002/jcb.22727)
6. Muller Y.A., Christinger H.W., Keyt B.A., de Vos A.M. The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure*. 1997. V. 5. P. 1325–1338. doi: [10.1016/s0969-2126\(97\)00284-0](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(97)00284-0)
7. *DisGeNET v7.0*. URL: <https://www.disgenet.org/> (accessed 21.09.2022).
8. *Open Targets Platform v.22.02*. URL: <https://platform.opentargets.org/> (accessed 21.09.2022).
9. Kazakov A.S., Sofin A.D., Avkhacheva N.V., Denesyuk A.I., *et al.* Interferon Beta Activity Is Modulated via Binding of Specific S100 Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. doi: [10.3390/ijms21249473](https://doi.org/10.3390/ijms21249473)
10. *SCOP*. URL: <https://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/> (accessed 21.09.2022).
11. *PONDR*. URL: <http://www.pondr.com/> (accessed 21.09.2022).
12. *AlphaFold*. URL: <https://alphafold.ebi.ac.uk/> (accessed 21.09.2022).
13. *I-TASSER*. URL: <https://zhanggroup.org/I-TASSER/> (accessed 21.09.2022).
14. *PyMOL v.2.5.0*. URL: <https://pymol.org> (accessed 21.09.2022).
15. *Pairwise Structure Alignment RCSB PDB*. URL: <https://www.rcsb.org/alignment> (accessed 21.09.2022).
16. *Stride Web interface*. URL: <http://webclu.bio.wzw.tum.de/cgi-bin/stride/stridecgi.py> (accessed 21.09.2022).
17. Permyakov S.E., Vologzhannikova A.A., Emelyanenko V.I., Knyazeva E.L., *et al.* The impact of alpha-N-acetylation on structural and functional status of parvalbumin. *Cell Calcium*. 2012. V. 52. P. 366–376. doi: [10.1016/j.ceca.2012.06.002](https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.06.002)