

Акуневич А.А.¹, Хрусталёв В.В.¹, Хрусталёва Т.А.²

**Олигомерное состояние эпидермального фактора роста человека
в растворе**

¹УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
Минск, Республика Беларусь

²ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск, Республика Бе-
ларусь

Эпидермальный фактор роста (ЭФР) представляет собой пептид, со-
держащий 53 аминокислотных остатка с общей молекулярной массой
6,4 кДа. Мономерная форма ЭФР стимулирует димеризацию и после-

дующую активацию его рецептора [1]. В то же время показано, что ЭФР способен образовывать димеры за счёт формирования межмолекулярного бета-листа в районе С-концевых остатков 44-Tyr-Arg-45 двух молекул [2]. Однако данная структура была получена для укороченного на два аминокислотных остатка по С-концу пептида при рН 8,1, что лишь косвенно отвечает на вопрос о возможности существования олигомерных форм ЭФР в растворе с физиологическим значением рН и температуры.

Цель работы — выявить наличие мономерных форм ЭФР в его растворе при рН 7,4 и температурах 20 °С, 37 °С и 50 °С.

Материалы и методы исследования. Растворы ЭФР объёмом 500 мкл с концентрацией пептида 0,05 мкг/мкл пропускали через фильтр с мембраной из восстановленной целлюлозы и размером пор 10 кДа. Фильтрацию осуществляли при следующих условиях: при температуре 20 °С, после термостатирования в течение часа при 37 °С и после нагревания в течение 20 минут на водяной бане до 50 °С. Полученные фильтраты разводили до 1 мл. В качестве раствора сравнения использовался раствор ЭФР объёмом 1 мл с концентрацией пептида 0,025 мг/мл, не подвергавшийся фильтрации. Спектры флуоресценции фильтратов и раствора сравнения снимались на спектрофлуориметре Solar CM2203 в диапазоне λ_{Em} от 300 нм до 400 нм при $\lambda_{Ex} = 280$ нм и в диапазоне λ_{Em} от 305 нм до 405 нм при $\lambda_{Ex} = 295$ нм. Регистрация спектров осуществлялась с шагом 1 нм, ширина щелей составляла 2 нм.

Результаты и выводы. При λ_{Ex} равной 280 нм и 295 нм для спектров флуоресценции ЭФР характерны два пика на λ_{Em} равной 330 нм и 357 нм. При этом интенсивность флуоресценции ЭФР при $\lambda_{Ex} = 295$ нм выше (4,42 отн. ед. при $\lambda_{Em} = 330$ нм; 4,60 отн. ед. при $\lambda_{Em} = 357$ нм), чем при $\lambda_{Ex} = 280$ нм (2,45 отн. ед. при $\lambda_{Em} = 330$ нм; 2,48 отн. ед. при $\lambda_{Em} = 357$ нм). После фильтрации раствора при 20 °С характерные для ЭФР пики флуоресценции на спектре не обнаруживаются, и интенсивность спектра колеблется ниже 0,02 отн. ед. при $\lambda_{Ex} = 280$ нм и ниже 0,05 отн. ед. при $\lambda_{Ex} = 295$ нм, что составляет менее 1% от интенсивности пиков раствора сравнения. После нагревания раствора до 37 °С и его фильтрации пики флуоресценции принимают характерную для спектра ЭФР форму, однако их интенсивность остаётся малой и колеблется в пределах 0,02–0,03 отн. ед. при $\lambda_{Ex} = 280$ нм и 0,02–0,06 отн. ед. при $\lambda_{Ex} = 295$ нм, что составляет около 1,3% от интенсивности пиков раствора сравнения. После нагревания раствора до 50 °С и его фильтрации интенсивность характерных для ЭФР пиков увеличивается и составляет около 0,1 отн. ед. при $\lambda_{Ex} = 280$ нм ($\lambda_{Em} = 330$ нм и $\lambda_{Em} = 357$ нм), 0,19 отн. ед. ($\lambda_{Em} = 330$ нм) и 0,22 отн. ед. ($\lambda_{Em} = 357$ нм) при

$\lambda_{\text{Ex}} = 295$ нм, что составляет около 4,5% от интенсивности пиков раствора сравнения. Согласно полученным данным, при температуре раствора 20 °С, 37 °С, 50 °С и физиологическом значении рН ЭФР преимущественно существует в олигомерных формах, порядок которых может начинаться с димеров молекулярной массой около 13 кДа. При 20 °С и 37 °С степень диссоциации олигомеров ЭФР остаётся крайне низкой, тогда как увеличение температуры до 50 °С вызывает некоторый сдвиг в сторону образования мономерных форм.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРФФИ Б20М-025 от 04.05.2020 г.

Литература

1. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and its dimerization / H. S. Lu, J. J. Chai, M. Li et al. // The Journal of biological chemistry. – 2001. – № 276. – P. 34913–34917.
2. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains / H. Ogiso, R. Ishitani, O. Nureki et al. // Cell. – 2002. – № 110. – P. 775–787.