

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ФАКТОР РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ (ФРФ-2): ЭКСПРЕССИЯ И АНАЛИЗ ФОЛДИНГА И СТАБИЛЬНОСТИ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИЕЙ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИЕЙ

Власов А. П., Скриган Т. Н., Русанович Д. А., Коцюбок В. М., Марцев С. П.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Среди семейства факторов роста фибробластов (далее — ФРФ) в клеточных технологиях критически важным и затратным при применении является ФРФ-2. Для устранения ограничений развития отечественных клеточных технологий сконструирован, экспрессирован в *E. coli* и очищен рекомбинантный ФРФ-2 человека. С целью установления основных параметров фолдинга и механизмов стабилизации ФРФ-2 нами методами сканирующей калориметрии и флуоресцентной спектроскопии исследована третичная структура и рН-стабильность белка. Получены новые данные о термо- и термодинамической стабильности ФРФ-2, рН-зависимой динамике локальных сегментов третичной структуры и формировании интермедиата фолдинга белка. Результаты представляют количественное физико-химическое обоснование ранее сделанных предположений о низкой стабильности ФРФ-2 как детерминанте снижения его эффективности в процессах экспансии стволовых клеток.

Ключевые слова: фактор роста фибробластов, клеточные технологии, фолдинг белка, конформация и стабильность белков, дифференциальная сканирующая калориметрия, флуоресцентная спектроскопия.

Введение. Фактор роста фибробластов-2 (ФРФ-2, или основной ФРФ-2 — по «щелочному» значению изоэлектрической точки, $pI = 9,8$) принадлежит семейству ФРФ, включающему более 20 членов группы, обладающих мито- и ангиогенной активностью, реализованной через взаимодействия с 4 основными рецепторами тирозинкиназного типа. Кроме собственной цитокиновой активности ФРФ-2 способен модифицировать процессы ангио- и васкулогенеза, контролируемые белками семейства VEGF — фактора роста эндотелия сосудов. Эти свойства привели к многочисленным доклиническим исследованиям ФРФ-2 как потенциального средства коррекции патологии сосудов, опухолевой прогрессии, костного ремоделирования и гипертрофии миокарда [1].

ФРФ-2 обладает набором уникальных структурных характеристик, отличающих его от «среднестатистического» глобулярного однодоменного белка. К таким характеристикам относятся: 1) наличие среди 155 аминокислотных остатков белка 4-х остатков цистеина, сульфгидрильные группы, которые не замкнуты ни в одну дисульфидную связь и, по существующим данным, не вовлечены в прямое взаимодействие с рецептором как пусковым механизмом реализации функциональной активности. В связи с этим в отношении сульфгидрильных групп ФРФ-2 иногда применяется термин «рудиментарные» [2], т. е. не играющие ни структурной, ни функциональной роли; 2) сильноосновной характер белка с изоэлектрической точкой $pI = 9,8$ вследствие 2-кратного превышения числа остатков «основных» диаминокислот лизина, Lys и аргинина, Arg (в сумме 24) над 12 остатками дикарбоновых аминокислот — аспарагиновой (Asp) и глутаминовой (Glu) в сочетании с 3) асимметричной локализацией заряженных остатков. В центральной части молекулы ФРФ-2 заряды распределены относительно равномерно, в то время как отношение Lys+Arg к Asp+Glu среди 50 остатков в С-концевой части белка составляет 10:1 против соотношения 5:8 среди 60 N-терминальных аминокислот.

Структурные свойства ФРФ-2 через пока не установленные конкретные механизмы связаны со сниженной операционной (функциональной) стабильностью белка при физиологических условиях ($pH = 7-8$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Высказано предположение, что высокие концентрации ФРФ-2 в культуральных средах при экспансии стволовых клеток необходимы в связи с низкой стабильностью ростового фактора [3]. Период полуйнактизации ФРФ-2 при физиологических условиях составляет около 9 ч, что диктует необходимость ежедневного добавления ФРФ-2 и делает неизбежными временные колебания его концентрации в культуральной среде.

Данные об операционной стабильности ФРФ-2 получены на основании анализа функциональной (тирозинкиназной) активности белка в культуре клеток. В то же время прямые физико-химические измерения стабильности ФРФ-2 в доступных источниках не представлены, что может быть связано с практическим значением белка и доминирующей ролью в исследованиях ФРФ-2 биотехнологических компаний.

Цель работы — получение рекомбинантного ФРФ-2 человека, определение его биологической активности в сочетании с анализом фолдинга и стабильности белка высокоразрешающими методами сканирующей калориметрии и флуоресцентной спектроскопии с конечной целью установления основных структурных характеристик белка, определяющих его третичную структуру, стабильность и функциональную активность.

Материалы и методы. Для получения штамма-продуцента ФРФ-2 человека проведен анализ гена и оптимизация его первичной структуры путем компьютерного моделирования оптимальных по кодонам транспортных РНК для увеличения синтеза белка в бактериальных клетках. Выполнен дизайн 24 олигонуклеотидов, методом полимеразной цепной реакции проведен синтез гена с его последующим клонированием в плазмиду для экспрессии pET-22b+ («Novagen», США). Правильность ориентации и структуры вставки доказаны рестрикционным анализом и секвенированием. На основе плазмиды BL21(DE3)/pET-FGF-2 и штаммов *E. coli* BL21 (DE3) создана система бактериальной экспрессии ФРФ-2 и штаммы-продуценты, синтезирующие целевой полипептид с уровнем экспрессии, составляющим более 30 % общего белка. Штаммы для экспрессии выбраны с учетом содержания амплифицированных копий генов редких т-РНК, соответствующих содержанию в структуре гена ФРФ-2 редких для *E. coli* кодонов аминокислот. Синтез ФРФ-2 индуцировали добавлением в среду изопропил- β -D-тиогаляктопиранозид (ИПТГ) до концентрации 1 мМ.

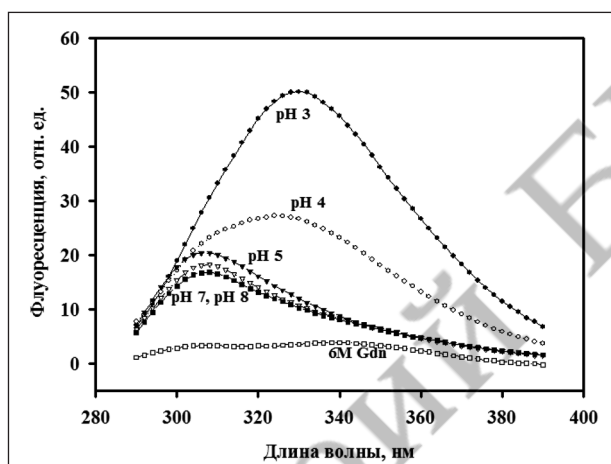
Спектры флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра SM-2203 («Solar», Минск, Беларусь) при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в термостатируемой кювете с длиной оптического пути 1 см. Образцы белка разводили до конечной концентрации 0,05–0,08 мг/мл в буфере требуемого состава и pH и инкубировали в течение ночи на холоде для достижения состояния равновесия. Спектры флуоресценции комплекса АНС (8-анилино-1-нафтилсульфонат) с ФРФ-2 регистрировали как описано ранее [4], в диапазоне 400–600 нм (длина волны возбуждения — 360 нм) и корректировали вычитанием спектра флуоресценции АНС без белка. Оптимизированное молярное соотношение АНС: белок [5] равнялось 10:1. Перед началом измерений образцы инкубировали 2 ч при комнатной температуре.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (далее — ДСК) выполнена на сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4М («Биоприбор», Пушкино, РФ) в температурном диапазоне 10–100 $^{\circ}\text{C}$ при скорости нагрева 60 К/ч. Использовали следующие буферные растворы: 0,05 М натрий-фосфатный, pH 6–8; 0,05 М ацетатный pH = 3–5 и KCl-HCl буфер при pH = 2,0. Из полученных кривых теплоемкости вычитали базовую линию, полученную при заполнении обеих ячеек буфером. Концентрации белков варьировали в пределах от 0,5 до 0,8 мг/мл. Калориметрическую энтальпию Δh тепловой денатурации белка рассчитывали с использованием программы TERMCALC («Биоприбор», Пушкино, РФ) [5]. Для каждого образца было выполнено 3–4 сканирования с погрешностью измерения Δh 5–6 %.

Результаты и их обсуждение. Получение рекомбинантного ФРФ-2. Технологией рекомбинантных ДНК нами созданы штаммы-продуценты BL21 (DE3)/pET-FGF2, синтезирующие ФРФ-2 с базовым уровнем экспрессии 30–70 мг белка на 1 л культуральной среды. Выход значительно увеличивается при

высокоплотном культивировании штамма в биореакторе. Наиболее эффективный синтез целевого белка наблюдается в штаммах *E. coli* BL21-Codon Plus(DE3)-RIPL и *E. coli* BL21-STAR. Разработан метод очистки ФРФ-2, который включает стадию лизиса бактериальных клеток, солюбилизацию денатурированного белка в гидрохлориде гуанидина и ренатурацию белка с применением специально разработанного протокола конкурентного рефолдинга ФРФ-2 в присутствии ионообменного сорбента. Элюция сорбента градиентом концентрации NaCl дает обогащенный препарат ФРФ-2, хроматография которого на гепарин-сефарозе позволяет получить конечный продукт — полипептид с молекулярной массой около 17 кДа, соответствующей расчетной и электрофоретической чистотой 92–97 %.

Флуоресцентная спектроскопия. Спектры собственной флуоресценции ФРФ-2 при длине волны возбуждения 280 нм (рисунок 1) демонстрируют максимум эмиссии в области 305 нм, относящейся к тирозинильным флуорофорам (которых 7 в молекуле ФРФ-2), и невысокую интенсивность флуоресценции, что характерно для остатков тирозина в белках. Флуоресценция наиболее мощного белкового флуорофора-триптофанильного погашена при физиологической и слабокислой рН (рН = 5–7) вследствие пространственного сближения единственного в молекуле ФРФ-2 остатка триптофана (Тр-123) с внутримолекулярным тушителем. В результате молекула ФРФ-2 при нейтральной рН гипофлуоресцентна.



Нижняя кривая — спектр флуоресценции денатурированного белка в 6 М гидрохлориде гуанидина

Рисунок 1. — Спектры флуоресценции ФРФ-2: зависимость от рН

Флуоресценция триптофана в ФРФ-2 становится очевидной и интенсивной при снижении рН до 4 и далее до 2–3 в условиях значительного снижения зарядовых взаимодействий белка за счет исчезновения заряда карбоксильных групп при их протонировании. Максимум флуоресценции смещается в область 330–332 нм с одновременным значительным увеличением интенсивности эмиссии. Такие изменения в спектрах флуоресценции характерны для удаления тушителя из микроокружения триптофана при сохранении неполярного характера окружения флуорофора. В результате эмиссия Тр-123 в ФРФ-2 многократно возрастает по сравнению с нативным состоянием. В совокупности эти данные свидетельствуют об изменении в локальном сегменте третичной структуры ФРФ-2, включающем Тр-123 и его микроокружение.

Анализ связывания флуоресцентного зонда АНС является общепринятым подходом к выявлению и характеристике частично структурированных состояний белков. Связывание зонда становится возможным благодаря флуктуациям ослабленной третичной структуры с частичным экспонированием заглубленных гидрофобных кластеров («гидрофобных карманов») белка и сопровождается коротковолновым сдвигом максимума флуоресценции зонда (в случае АНС — с 520 до 470 нм). Зонд АНС не связывается ни с белками в полностью компактной нативной конформации ввиду погруженности сгруппированных неполярных аминокислот в гидрофобное «ядро» белка, ни с полностью развернутым (денатурированным) белке ввиду отсутствия сгруппированных гидрофобных кластеров.

Связывание АНС с ФРФ-2 не выявляется при рН = 5–8: спектры флуоресценции зонда в присутствии белка не отличаются от спектров зонда без белка; эмиссия АНС-белкового комплекса при 470 нм отсутствует (рисунок 2).

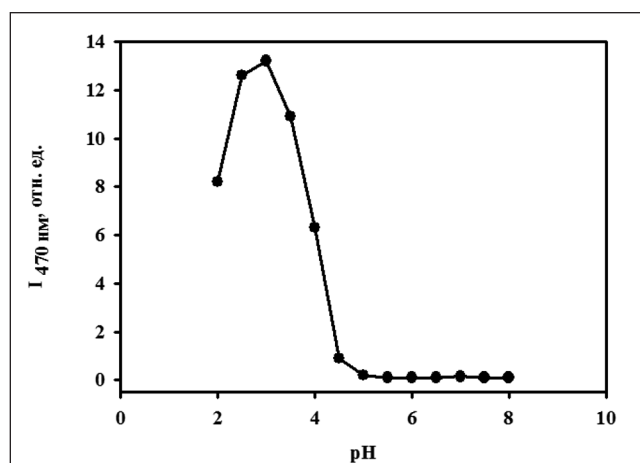


Рисунок 2. — pH-зависимость эмиссии связанного с ФРФ-2 флуоресцентного зонда АНС

При pH ниже 5 регистрируется появление эмиссии при 470 нм, характерное для комплексов АНС — белок, что означает pH-зависимую частичную дезорганизацию третичной структуры ФРФ-2 с потерей части структурных взаимодействий. Эмиссия градуально возрастает до pH 3, где наблюдается ее максимум, отражающий наибольшую заселенность частично разупорядоченного структурного состояния ФРФ-2.

Дальнейшее снижение pH ниже 3 приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции связанного АНС в результате дальнейшей потери третичных взаимодействий с формированием структуры, более близкой к развернутому денатурированному белку, чем к компактной нативной структуре.

Данные сканирующей калориметрии. Наши результаты позволили существенно дополнить данные проведенного ранее калориметрического исследования термостабильности ФРФ-2 [6], в которых анализировали только температуры тепловой денатурации белка без количественного определения основной характеристики термодинамической стабильности — энтальпии тепловой денатурации.

ФРФ-2 формирует калориметрически детектируемую третичную структуру в диапазоне pH = 5–8 (рисунок 3). Величины калориметрической энтальпии термоденатурации Δh (таблица) находятся на уровне, характерном для большинства однодоменных глобулярных белков (4,6 кал/г при pH 8 и 3,65 кал/г при pH 5). Это означает, что термодинамическая стабильность белка как интегральная характеристика структурных взаимодействий имеет величину, характерную для белков с полностью сформированной и стабилизированной третичной структурой.

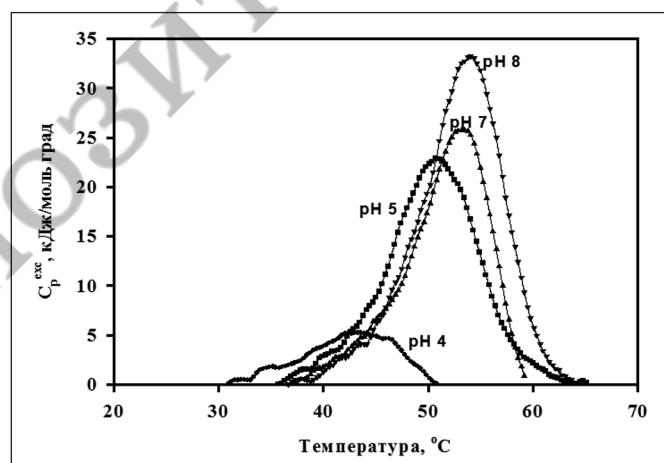


Рисунок 3. — Температурные кривые избыточной теплоемкости (C_p^{exc}) ФРФ-2 при изменении pH

Пиковые температуры термоденатурации T_m при pH 5–8 лежат в пределах 52–54 °C, что ниже диапазона 60–70 °C, в котором находятся величины T_m большинства глобулярных однодоменных белков. Величины T_m , полученные для ФРФ-2, характерны для группы белков со сниженной термостабильностью.

Таблица — Термодинамическая стабильность рекомбинантного ФРФ-2

pH	T _m , °C	Δh*, кал/г
8,0	54,5	4,63
7,0	54,0	3,82
6,0	53,0	4,12
5,0	52,0	3,65
4,0	43,0	0,84
3,0	—	0,0

* — расчет на молекулярную массу ФРФ-2 (17,2 кДа).

Тепловые переходы ФРФ-2 необратимы во всем исследованном диапазоне pH вследствие агрегации термоденатурированного белка, что установлено при повторном прогреве образцов в ячейке калориметра (не показано) после завершения первого цикла теплового сканирования и охлаждения до стартовой температуры 10 °C.

В диапазоне pH = 5–8 коэффициент кооперативности третичной структуры (CR, cooperativity ratio), определяемый как отношение экспериментально рассчитанной калориметрической энтальпии к расчетной эффективной энтальпии (или энтальпии Вант-Хоффа, $CR = \Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$), близок к значению 1,0. Это указывает на мономерное состояние ФРФ-2 в диапазоне pH = 5–8. Данные о мономерном состоянии ФРФ-2 не удается получить наиболее часто используемым методом гель-проникающей хроматографии ввиду высокой неспецифической сорбции гидрофобной молекулы ФРФ-2 на матрицах хроматографических носителей (данные не приводятся).

Значительные изменения в ходе температурной кривой теплопоглощения наблюдаются при pH = 4 в условиях, в которых по данным собственной флуоресценции белка и связывания флуоресцентного зонда АНС происходит формирование частично разупорядоченного состояния. Калориметрическая энтальпия уменьшается почти в 6 раз до критически низкого значения 0,84 кал/г, при этом температура полуперехода падает до 43 °C. Такая величина калориметрической энтальпии характерна для белков в состоянии «расплавленной глобулы» («molten globule») — компактного денатурированного состояния [7]. Для этой группы конформационных состояний характерна потеря части структурных взаимодействий при сохранении общей компактности дестабилизированной третичной структуры с сохранением гидрофобного «ядра» белка и экранированием неполярных ароматических флуорофоров от контакта с растворителем. При этом по крайней мере часть неполярных кластеров белка доступна для связывания гидрофобных флуоресцентных зондов — АНС, Конго красного, нильского красного, тиофлавина Т и др.

При pH = 3 в условиях, близких к полной потере стабилизирующих зарядовых взаимодействий в результате протонирования карбоксильных групп и доминирования расталкивающих взаимодействий положительно заряженных аминокислотных групп, получена «плоская» кривая теплопоглощения (не показано), лишенная пикового перехода, что свидетельствует о разрушении калориметрически регистрируемой третичной структуры ФРФ-2.

Биологическая активность рекомбинантного ФРФ-2 определена в тесте по стимуляции пролиферативной активности клеточной линии 3Т3 фибробластов эмбрионов мыши. Клетки 3Т3 выращивали в питательной среде ДМЕМ/F12 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки как источника ростовых факторов. Для определения ростостимулирующей активности полученного ФРФ-2 суспензию клеток растили в течение 40 ч в среде ДМЕМ/F12, лишенной ростовых факторов эмбриональной сыворотки, с добавлением возрастающих концентраций ФРФ-2 (0,05–500 нг/мл).

Кривая зависимости показателя роста клеток от концентрации ФРФ-2 имеет насыщаемый характер и в полулогарифмических координатах представляет собой сигмоид (данные не показаны), что характерно для лиганд-рецепторных взаимодействий с ограниченной емкостью центров специфического связывания. Биологическая активность рекомбинантного ФРФ-2 сравнима с активностью коммерческих препаратов и характеризуется концентрацией полумаксимальной стимуляции роста клеток (C₀₅) на уровне 0,25 нг/мл, или 1,4×10⁸ нМ ФРФ-2, что соответствует величинам C₀₅, характерным для большинства коммерчески доступных препаратов ФРФ-2 и согласуется с опубликованными величинами равновесных констант диссоциации комплекса рецептор-ФРФ-2.

Заключение. Получен генноинженерный ФРФ-2. Эффективность системы экспрессии составляет от 30 до 70 мг белка на 1 л культуры штамма-продуцента со значительным увеличением выхода белка при высокоплотном культивировании в биореакторе.

Биологическая активность ФРФ-2, определенная по стимуляции роста клеточной линии 3Т3, находится на уровне величин, характерных для коммерческих препаратов. При этом концентрация полумак-

симальной стимуляции роста клеток $C_{05} = 0,25$ нг/мл на 2 порядка меньше концентраций ФРФ-2, используемых для экспансии стволовых клеток. Это сравнение позволяет предположить, что функциональная активность ФРФ-2 в клеточных технологиях контролируется не основными механизмами, связанными с белок-рецепторным взаимодействием, а в большей степени иными факторами, в число которых входит операционная стабильность ФРФ-2.

Термодинамическая стабильность ФРФ-2. Учитывая существующие данные о низкой стабильности ФРФ-2 в условиях роста клеточных культур, а также особенности структуры белка, лишённого стабилизирующих дисульфидных связей, мы провели анализ термодинамической стабильности как глобальной характеристики третичной структуры, отражающей сумму структурных взаимодействий белка, а также рН-зависимой локальной стабильности полипептидных сегментов белка.

Установлено, что калориметрическая энтальпия денатурации ФРФ-2 находится на уровне однодоменных белков с полностью сформированной третичной структурой. Это означает, что отсутствие стабилизирующего вклада дисульфидов компенсировано взаимодействиями иной природы.

В то же время термодинамические измерения с помощью сканирующей калориметрии подтвердили относительно низкую термостабильность ФРФ-2, которая ранее предполагалась лишь на основе непрямых наблюдений, в частности из данных о коротком времени полуинактивации ФРФ-2 в культуральной среде [3]. Пиковые температуры тепловой денатурации ($T_m = 53\text{--}54$ °С при рН = 6–8) ниже температур 60–70 °С, характерных для большинства глобулярных белков. Это позволяет отнести рекомбинантный ФРФ-2 к группе белков со сниженной термостабильностью. В сочетании с необратимостью тепловых переходов сравнительно низкая термостабильность ФРФ-2 является фактором, способным снизить операционную, или относительную, стабильность нативного состояния белка за счет перехода в частично развернутый интермедиат, подверженный тепловой агрегации. Тепловая агрегация может представлять собой один из конкретных механизмов снижения функциональной активности рекомбинантного ФРФ-2 человека.

Динамика локальных сегментов третичной структуры, имеющая отношение к операционной стабильности ФРФ-2. Фактором снижения стабильности белка и потери им активности является переход в частично развернутые состояния (интермедиаты фолдинга), промежуточные по степени структурной организации между полностью компактным нативным и полностью развернутым денатурированным состояниями. Такие интермедиаты обнаружены для большинства белков и, как правило, лишены активности в результате потери части структурных взаимодействий. Переход в эти состояния происходит при изменении сольвентных условий (температуры, рН, состава среды) и связан с динамикой локальных сегментов третичной структуры.

В соответствии с предсказуемо высокой конформационной подвижностью ФРФ-2 ввиду отсутствия внутримолекулярных дисульфидов как важных компонентов стабилизации третичной структуры нами обнаружена высокая рН-зависимая динамика локальных сегментов белка, несущих ароматические флуорофоры тирозин и триптофан, в диапазоне рН 5–2. Динамика заключается в удалении флуорофоров от внутримолекулярных тушителей флуоресценции без изменения неполярного характера микроокружения флуорофора.

Как второй элемент структурной динамики со снижением рН значительно меняется степень экспонирования гидрофобных кластеров белка по данным связывания гидрофобного флуоресцентного зонда АНС. В узком диапазоне рН от 4,5 до 3 экспонирование гидрофобных кластеров резко возрастает, достигая максимума при рН = 3. Эти изменения связаны с формированием частично разупорядоченного интермедиата ФРФ-2, заселенность которого резко нарастает при рН ниже 4,5 и достигает максимума при рН = 3, а затем в диапазоне рН 3–2 так же резко уменьшается.

Интермедиат фолдинга ФРФ-2 при рН = 3 компактен, его гидрофобные остатки частично экспонированы и доступны для флуоресцентного зонда, но не имеет калориметрически выявляемой третичной структуры ниже рН = 4.

Интермедиат 1: «расплавленная глобула». При рН 4 сумма свойств интермедиата, включая сниженную структурную энергетику, сохранение общей компактности белка при потере части структурных взаимодействий и способность связывать гидрофобный зонд АНС, совместима с характеристиками «расплавленной глобулы» («molten globule» [7]), которая рассматривается как компактное денатурированное состояние белка с флуктуирующей третичной структурой. Роль «расплавленной глобулы» определяется тем, что она служит ключевым интермедиатом как фолдинга белка из развернутого состояния в компактное, так и его разворачивания из полностью компактной нативной структуры при изменении физических либо химических условий. Ввиду способности к ассоциации и формированию нерастворимых агрегатов интермедиат 1 представляет собой кинетическую «ловушку», снижающую содержание активной формы нативного ФРФ-2.

Главной характеристикой интермедиата 1 является критически низкая структурная энергетика (термодинамическая стабильность) в терминах энтальпии денатурации ($\Delta h = 0,84$ кал/г) при сохранении калориметрически выявляемой третичной структуры. Это предполагает глубокую реорганизацию («reshuffling») третичной структуры ФРФ-2 с потерей большей части структурных взаимодействий.

Терминальный интермедиат 2. Резкое снижение связывания АНС ниже рН 3 отражает формирование еще менее упорядоченного (терминального по количеству остаточной структуры) состояния, сохраняющего лишь минимальное количество элементов третичной структуры, судя по положению максимума эмиссии триптофана. Для этого состояния характерны потеря большей части структурных взаимодействий и полное экспонирование остатков гидрофобных аминокислот, что в совокупности приводит в потере пика теплового перехода при сканирующей калориметрии уже при рН 3 и потере связывания АНС при рН ниже 3.

Роль зарядовых взаимодействий в ФРФ-2. Установленный характер рН-зависимых изменений третичной структуры ФРФ-2 отражает особенности зарядовых взаимодействий и их необычно высокий вклад в фолдинг и стабильность этого сильно основного белка (pI = 9,8) с радикально смещенным балансом зарядов аминокислот. Белок обладает высокой рН-зависимостью третичной структуры, что равнозначно низкой рН-стабильности. Это проявляется: 1) в локальных изменениях микроокружения ароматических флуорофоров при рН ниже 5,0; 2) в резком увеличении связывания гидрофобного зонда АНС в диапазоне рН 4,5–3,0 за счет экспонирования гидрофобных кластеров третичной структуры ФРФ-2; 3) в разрушении значительной части третичной структуры при рН ниже рН 4, что установлено потерей пика при сканирующей калориметрии в сочетании с потерей связывания флуоресцентного зонда АНС; 4) в радикальной перегруппировке ослабленной третичной структуры при рН < 4 с формированием заселенного в узком диапазоне рН интермедиата 1.

Характер рН-динамики третичной структуры ФРФ-2 позволяет предположить, что зарядовые взаимодействия могут служить одним из механизмов компенсации дефицита стабилизирующего вклада внутримолекулярных дисульфидов. Однако сопутствующим негативным итогом такого механизма стабилизации является низкая рН стабильность белка и значительная степень изменений третичной структуры при изменении рН как фактора, нарушающего баланс зарядов и их взаимодействие в молекуле ФРФ-2.

Выводы:

1. Получен, экспрессирован в *E. coli* и хроматографически очищен рекомбинантный фактор роста фибробластов ФРФ-2, содержащий последовательность из 154 аминокислот ФРФ-2 человека и дополнительный N-концевой метионин.

2. Биологическая активность ФРФ-2 находится на уровне величин, характерных для коммерческих препаратов и на 2 порядка меньше концентраций ФРФ-2, используемых для экспансии стволовых клеток, что согласуется с предположением о низкой операционной стабильности белка.

3. Измеренная сканирующей калориметрией энтальпия термоденатурации как интегральная характеристика всех структурных взаимодействий показала, что отсутствие стабилизирующего вклада дисульфидов в ФРФ-2 компенсировано взаимодействиями иной природы.

4. Установлена низкая рН-стабильность локальных сегментов третичной структуры ФРФ-2, сближенных с флуорофорами, что отражает высокий вклад зарядовых взаимодействий в стабильность белка как механизм компенсации дефицита вклада дисульфидов.

5. При анализе рН-динамики ФРФ-2 обнаружен частично разупорядоченный интермедиат фолдинга белка как фактор потенциального снижения его операционной стабильности за счет способности интермедиата к формированию нерастворимых агрегатов, снижающих содержание активной формы белка.

6. Результаты представляют количественное физико-химическое обоснование ранее сделанных предположений о низкой стабильности ФРФ-2 как факторе снижения его эффективности в процессах экспансии стволовых клеток.

Литература

1. Bottcher, R. T. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development / R. T. Bottcher, C. Niehrs // *Endocr. Rev.* — 2005. — Vol. 26, № 1. — P. 63–77.

2. Lee, J. Structural Basis of Conserved Cysteine in the Fibroblast Growth Factor Family: Evidence for a Vestigial Half-Cystine / J. Lee, M. Blaber // *J. Mol. Biol.* — 2009. — Vol. 393, № 1. — P. 128–139.

3. Atkinson, S. P. Too hot for FGF? — Thermal Stability of FGF Protein is a Determinant Factor in Regulating Self-Renewal, Differentiation and Reprogramming in Human Pluripotent Stem cells // *Stem Cell Portal* — 2012 — Website address: <https://www.stemcellportal.com/content/too-hot-fgf—thermal-stability-fgf-protein-determinant-factor-regulating-self-renewal>.

4. Antiferritin VL homodimer binds human spleen ferritin with high specificity / Z. Kravchuk [et al.] // *J. Struct. Biol.* — 2002. — Vol. 138, № 3. — P. 171–186.

5. Folding of an antibody variable domain in two functional conformations *in vitro*: calorimetric and spectroscopic study of the anti-ferritin antibody VL domain / Y. I. Tsybovsky [et al.] // *Prot. Eng. Design & Select.* — 2007. — Vol. 20, № 10. — P. 481–490.

6. The stability of bFGF against thermal denaturation / S. Vemuri [et al.] // *J. Pharm. Pharmacol.* — 1994. — Vol. 46, № 6. — P. 481–486.

7. Ptitsyn, O. B. Molten globule and protein folding / O. B. Ptitsyn // *Adv. Prot. Chem.* — 1995. — Vol. 47. — P. 83–229.

**RECOMBINANT FIBROBLAST GROWTH FACTOR (FGF-2):
EXPRESSION AND STUDY OF FOLDING AND STABILITY
BY SCANNING CALORIMETRY AND FLUORESCENCE SPECTROSCOPY**

Vlasov A. P., Skryhan T. M., Rusanovich D. A., Katsiubka U. M., Martsev S. P.

*State Institution “The Scientific and Practical Center of Blood Transfusion and Medical Biotechnology”,
Minsk, Republic of Belarus*

Among the family of fibroblast growth factors (FGF) generally employed in cell technologies, FGF-2 is of critical importance and high cost in use. To avoid limitations for development of cell technologies in Belarus, we designed, expressed in *E. coli* and purified human recombinant FGF-2. In order to establish basic mechanisms behind the FGF-2 folding and stability, we considered, by scanning calorimetry and fluorescence spectroscopy, the tertiary structure and pH-stability of the protein. The results obtained provide novel data on the thermo- and thermodynamic stability of FGF-2, the pH-dependent dynamics of local segments of the tertiary structure, and the formation of the protein folding intermediate. These data provide a quantitative physicochemical background for a low stability of FGF-2 previously presumed as a major determinant of the reduced efficiency of the protein in the processes of stem cell expansion.

Поступила 16.07.2018