

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ
УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«ИНСТИТУТ БИОХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

Объект авторского права
УДК 577.112:547.466(043.3)

АКУНЕВИЧ
Анастасия Александровна

**ПОЛУЧЕНИЕ, СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ОЦЕНКА
БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА
РОСТА С АМИНОКИСЛОТНОЙ ЗАМЕНОЙ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.01.04 – биохимия

Гродно 2025

Научная работа выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Научный руководитель: **Хрусталёв Владислав Викторович,**
доктор биологических наук, доцент, декан биологического факультета Белорусского государственного университета

Официальные оппоненты: **Заводник Илья Борисович,**
доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биохимии учреждения образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы»

Жерносеков Дмитрий Данилович,
доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры фундаментальной и прикладной биологии учреждения образования «Витебский государственный университет имени П. М. Машерова»

Оппонирующая организация: учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

Защита состоится 2 июля 2025 года в 14.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 01.30.01 при республиканском научно-исследовательском унитарном предприятии «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 230023, г. Гродно, пл. Антония Тызенгауза, 7; e-mail: office@ibiochemistry.by, тел/факс: 8 (0152) 55-87-78.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке республиканского научно-исследовательского унитарного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси».

Автореферат разослан 30 мая 2025 года.

Учёный секретарь
совета по защите диссертаций
кандидат биологических наук

Ж.В. Мотылевич

ВВЕДЕНИЕ

Эпидермальный фактор роста человека (EGF) – полипептид, состоящий из 53 аминокислотных остатков и содержащий консервативный EGF-подобный домен с тремя дисульфидными связями [Carpenter G., Cohen S., 1979; Ogiso H. et al., 2002]. В медицине широко используются ингибиторы тирозинкиназы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) и антагонисты этого рецептора, в том числе моноклональные антитела и их фрагменты [Liang H. et al., 2016; Ciardiello F. et al., 2024].

Ранее в качестве противоопухолевого агента предлагали использовать и сам полноразмерный EGF в виде конъюгата с апоптином [Niesler N. et al., 2020], дифтерийным токсином [Qi Z. et al., 2021], укороченным экзотоксином *P. aeruginosa* [Hashimi S. M. et al., 2018] и сапорином [Thakur M. et al., 2013] для их адресной доставки в опухолевые клетки. Для этой цели также исследовались короткие фрагменты EGF [Hosseini-Nejad-Ariani H. et al., 2019]. Однако полноразмерные мутантные формы EGF, блокирующие активацию EGFR, в качестве самостоятельных агентов для терапии опухолей ранее не рассматривались.

Также остаётся открытым вопрос о существовании димеров полноразмерного EGF в водном растворе в физиологических условиях и их роли во взаимодействии лиганда с рецептором. По состоянию на январь 2025 года описана только одна структура димера EGF (PDB ID 1JL9), однако она была получена для его укороченных молекул (Cys6–Leu47) при нефизиологическом значении pH = 8,1. Эксперимент по восстановлению дисульфидных связей позволит оценить их роль в димеризации EGF и его мутантной формы, что важно для понимания молекулярных механизмов развития заболеваний, связанных с окислительным и восстановительным стрессом [Мартинovich Г. Г. и др., 2012; Канунникова Н. П. и др., 2023].

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами и темами

Диссертация выполнена в рамках грантов БРФФИ по следующим темам: «Разработка антагониста рецептора эпидермального фактора роста на основе модифицированного фактора роста эпидермиса» (договор № Б20М-025 от 04.05.2020, № гос. регистрации 20201208, сроки выполнения: 04.05.2020–31.03.2022), «Выявление структурно-динамических особенностей мутантных форм белка-предшественника бета-амилоидов методами молекулярного моделирования и спектрального анализа» (договор № Б21РМ-046 от 01.07.2021, № гос. регистрации 20213474, сроки выполнения: 01.07.2021–31.05.2023), а также в рамках НИР кафедры общей

химии УО «БГМУ» «Изучение особенностей лиганд-рецепторных взаимодействий с помощью разработанного способа выявления участков белков с нестабильной вторичной структурой» (№ гос. регистрации 20210135 от 16.02.2021, сроки выполнения: 01.01.2021–31.12.2025).

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы, утверждённым Указом Президента Республики Беларусь от 07.05.2020 № 156, а именно пункту «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства», подпунктам «Биотехнологии (геномные и постгеномные, клеточные, микробные, медицинские, промышленные)», «Системная и синтетическая биология», «Тонкий химический синтез», а также пункту «Цифровые информационно-коммуникационные и междисциплинарные технологии, основанные на них производства», подпункту «Математика и моделирование сложных функциональных систем (технологических, биологических, социальных)».

Цель, задачи, объект и предмет исследования

Цель исследования – разработать мутантную форму человеческого эпидермального фактора роста с аминокислотной заменой, снижающей его агонистическую активность, и проанализировать влияние этой замены на его пространственную структуру.

Задачи исследования:

1. Установить структуру синтетического эпидермального фактора роста в условиях, приближенных к физиологическим, и оценить влияние внешних факторов на формирование и диссоциацию его димеров.

2. Осуществить дизайн и установить структуру мутантной формы эпидермального фактора роста с аминокислотной заменой, снижающей его агонистическую активность за счёт нарушения взаимодействия с III доменом его рецептора.

3. Оценить роль дисульфидных связей в формировании правильной пространственной структуры и димеризации эпидермального фактора роста и его мутантной формы.

4. Изучить биологическую активность синтетической мутантной формы эпидермального фактора роста в культуре клеток эпидермоидной карциномы человека и в модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у животных.

5. Получить рекомбинантную форму мутантного эпидермального фактора роста с помощью системы бесклеточного синтеза белка и изучить его биологическую активность в культуре клеток эпидермоидной карциномы человека.

Объект исследования – человеческий EGF, его мутантная форма и их комплексы с рецептором.

Предмет исследования: нуклеотидные и аминокислотные последовательности EGF-подобных факторов роста; модели пространственной структуры EGF и его мутантной формы; межмолекулярные взаимодействия в комплексах EGF-подобных факторов роста и EGFR; спектры флуоресценции и кругового дихроизма, ИК спектры синтетических пептидов EGF и его мутантной формы; активность EGF и его мутантной формы в культуре клеток эпидермоидной карциномы человека; активность EGF и его мутантной формы в модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у животных.

Научная новизна

Установлено, что механизм связывания EGF с рецептором в водном растворе при pH = 7,4 и температуре от 35 °C до 40 °C включает частичную потерю вторичной структуры лиганда, тогда как диссоциация его димеров происходит при контакте с внеклеточными доменами рецептора.

Впервые предложена замена в положении Asp46 С-концевого фрагмента EGF, которая снижает его аффинность к III домену EGFR и приводит к частичной потере его агонистической активности. При этом несмотря на увеличение длины межмолекулярной β -структуры и снижение способности димеров EGF D46G к диссоциации, мономер мутантного EGF связывается с изолированным III доменом EGFR.

Впервые установлено влияние полного восстановления дисульфидных связей на формирование пространственной структуры димеров синтетического EGF и его мутантной формы с заменой D46G: происходит увеличение количества аминокислотных остатков в β -структуре и снижение способности димеров нативного EGF к диссоциации.

Впервые получена рекомбинантная форма мутантного EGF с помощью системы бесклеточного синтеза белка. Выявлено, что пространственная структура рекомбинантного пептида и его биологическая активность в культуре клеток эпидермоидной карциномы человека сопоставима с таковыми синтетического EGF D46G.

Положения, выносимые на защиту

1. Синтетический EGF в водном растворе при pH = 7,4 и температуре 37 °C существует преимущественно в димерной форме, в которой область контакта двух молекул формируется за счёт С-концевых минорных β -шпилек, а при температуре от 35 °C до 40 °C претерпевает переход из состояния с бóльшим содержанием аминокислотных остатков в составе β -структуры в состояние с бóльшим содержанием аминокислотных остатков в петлях. Разбавление раствора и повышение температуры до 50 °C способствует диссоциации его димеров, а связывание хлорид-ионов в области межмолекулярной β -структуры способствует повышению их устойчивости к влиянию данных факторов.

2. Замена D46G в С-концевом фрагменте EGF, предложенная нами по результатам биоинформационного анализа, вызывает удлинение и перестройку межмолекулярной β -структуры, что приводит к переходу короткой С-концевой α -спирали в межмолекулярный β -лист, к повышению устойчивости димеров EGF D46G к нагреванию до 50 °С и разбавлению раствора, а также к повышению ригидности полипептидной цепи и предотвращению перехода пептида в состояние с бóльшим содержанием аминокислотных остатков в составе петель при температуре от 35 °С до 40 °С и pH = 7,4.

3. Полное восстановление дисульфидных связей в синтетических EGF и EGF D46G приводит к увеличению в них доли β -структуры в водном растворе пептидов при pH = 7,4, что не вызывает образование олигомеров более высокого порядка, но резко снижает способность димеров восстановленной формы синтетического EGF к диссоциации.

4. Синтетический EGF D46G не вызывает токсических эффектов у мышей линии Af и является частичным агонистом EGFR, так как в сравнении с синтетическим EGF обладает меньшей аффинностью к III домену EGFR и в меньшей степени стимулирует пролиферацию клеток эпидермоидной карциномы человека в бессывороточной среде, а при однократном подкожном введении совместно с клетками асцитной карциномы Эрлиха тормозит формирование солидных опухолей у мышей линии C57BL/6, включая 7 суток после инъекции.

5. Полученный с помощью системы бесклеточного синтеза белка эпидермальный фактор роста с заменой D46G (Met-EGF D46G) существует в растворе в виде димеров, за исключением отсутствия N-концевой α -спирали, имеет вторичную структуру, аналогичную таковой синтетического EGF D46G, в бессывороточной среде стимулирует пролиферацию клеток эпидермоидной карциномы человека в меньшей степени, чем синтетический EGF.

Личный вклад соискателя учёной степени

Постановка целей и задач исследования, дизайн мутантной формы EGF с помощью биоинформационных методов исследования, анализ полученных результатов, подготовка печатных работ к публикации проведена совместно с научным руководителем – деканом биологического факультета Белорусского государственного университета, д.б.н., доцентом Хрусталёвым В.В.

Получение рекомбинантной мутантной формы EGF с помощью системы бесклеточного синтеза белка, моделирование пространственной структуры мутантной формы EGF и его комплекса с EGFR, электрофорез исследуемых пептидов, иммунизация лабораторных животных, выделение кроличьих антител с помощью аффинной хроматографии из сывороток лабораторных животных проводилось автором лично.

Получение и анализ спектров кругового дихроизма проведены автором совместно с к.ф.-м.н., доцентом, заведующим лабораторией гемопротеидов НИИ Физико-химической биологии МГУ Арутюняном А.М. и д.б.н., ведущим научным сотрудником отдела хроматографического анализа НИИ Физико-химической биологии МГУ Кордюковой Л.В. Получение спектров флуоресценции, исследование острой токсичности, моделирование солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у животных и обработка результатов проведены автором совместно с к.б.н., учёным секретарем ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» Хрусталёвой Т.А. Получение ИК спектров и обработка результатов проведены автором совместно с к.т.н., старшим научным сотрудником центра физико-химических методов исследования УО «БГТУ» Чепрасовой В.И. Определение активности пептидов в культуре клеток НEr2С проведено автором совместно с д.м.н., ведущим научным сотрудником лаборатории вакциноуправляемых инфекций ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии» Ермолович М.А.

Результаты исследования опубликованы в совместных статьях, соавторы которых оказывали помощь в проведении экспериментов и интерпретации результатов (в [2–А, 3–А, 4–А, 5–А], личный вклад соискателя – 90 %). В некоторых публикациях автором выполнены отдельные этапы исследования (в [1–А] личный вклад соискателя – 20 %, в [6–А, 7–А] личный вклад соискателя – 30 %).

Апробация диссертации и информация об использовании её результатов

Результаты исследований, включённые в диссертацию, представлены на 11 научных конференциях: Научная сессия УО «БГМУ» (Минск, 2020, 2021, 2023, 2024); 74-я Международная научно-практическая конференция студентов и молодых учёных «Актуальные проблемы современной медицины и фармации – 2020» (Минск, 2020); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине» (Российская Федерация, Санкт-Петербург, 2020, 2021); Международная научная конференция, посвящённая 75-летию со дня рождения Е.В. Барковского «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, 2021); 45-й Конгресс FEBS «Molecules of Life – Toward New Horizons» (Словения, Любляна, 2021); Международная научная конференция «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, 2022); XXI Конференция молодых учёных, специалистов и студентов, посвящённая 60-летию Института медико-биологических проблем (Российская Федерация, Москва, 2023).

Результаты диссертационного исследования используются в научном процессе ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» (1 акт о внедрении), в научном и учебном процессе кафедры общей химии УО «БГМУ» (4 акта о внедрении), а также использовались при выполнении задания «Изучить антигенные свойства оригинальных синтетических пептидов для иммунопрофилактики и иммунодиагностики заболеваний, вызываемых парвовирусом В19», ГПНИ «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорхимия».

Опубликованность результатов диссертации

По материалам диссертации опубликовано 6 статей (в том числе 5 на английском языке) общим объёмом 5,69 авт. л. в рецензируемых научных журналах, соответствующих пункту 19 Положения о присуждении учёных степеней и присвоении учёных званий, 1 статья в отечественном научном журнале (0,37 авт. л.), 5 статей в сборниках научных статей и материалов конференций (1,16 авт. л.), 6 тезисов докладов (0,59 авт. л.).

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов (глава 2), трёх глав с анализом результатов собственных исследований (главы 3–5), заключения, списка использованных источников (включающего библиографический список и список публикаций соискателя) и 5 приложений.

Полный объём диссертации составляет 168 страниц, из которых 100 страниц занимает машинописный текст. Работа включает 25 рисунков, 8 таблиц, 5 приложений. Список использованных источников, содержащий 240 источников (включая 18 работ соискателя), составляет 22 страницы.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы исследования

Для дизайна мутантной формы EGF использовали биоинформационные методы: филогенетический анализ EGF-подобных факторов роста, оценка влияния отдельных аминокислотных замен на стабильность элементов вторичной структуры, моделирование пространственной структуры пептидов, их димеров и комплексов с EGFR, анализ межмолекулярных взаимодействий.

В качестве материала использовали два синтетических пептида EGF, полученных с помощью твёрдофазного химического синтеза (Elabscience, Китай): с нативной последовательностью NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG^YIGERCQYRDLKWWELR и его вариант с заменой D46G (положение выделено подчёркнутым шрифтом). Молекулярная масса мономера EGF равна 6,22 кДа, EGF D46G – 6,16 кДа. Концентрация EGF в его

насыщенном растворе в 0,01 М фосфатном буфере (ФБ) (pH = 7,4) составляла 495 мкг/мл, EGF D46G – 358 мкг/мл. Для восстановления дисульфидных связей использовали 0,5 М раствор трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР).

Рекомбинантный Met-EGF D46G (с N-концевым остатком Met) получен нами с помощью системы бесклеточного синтеза белка (БСБ) NEBExpress E5360S (New England Biolabs, США) и плазмидного вектора pUC57 (Synbio Technologies, США). Met-EGF D46G выделяли аффинной хроматографией на колонке с кроличьими антителами к синтетическому EGF D46G.

Голубой нативный электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ-электрофорез) проводили по стандартному протоколу [Wittig I. et al., 2006], модифицированному нами под задачи настоящей работы [2–А, 3–А, 4–А] и применённому для решения схожих задач [6–А, 7–А]. Для сравнения способности димеров пептидов к диссоциации их растворы фильтровали через центрифужный ультрафильтр с полиэфирсульфоновой мембраной и порогом отсека по молекулярной массе (MWCO) 10 кДа (Sartorius, Германия). Наличие мономеров определяли флуоресцентной спектроскопией по появлению в фильтрате спектров EGF [1–А] и EGF D46G [2–А].

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Solar CM2203, спектры ИК нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) – на ИК-спектрометре с приставкой многократного НПВО SMART Multi-Bounce NATR, спектры кругового дихроизма – на спектрометре Chirascan CD с последующей их деконволюцией с помощью ресурса BeStSel.

Для сравнения аффинности пептидов к III домену EGFR использовали колонку с иммобилизованным рекомбинантным III доменом EGFR человека (Atlas Antibodies, Швеция). Для элюирования использовали растворы при комнатной температуре и нагревании до 50 °С: 0,1 М ФБ с 0,15 М NaCl (pH = 7,4); 1 М NaCl; 0,2 М глицин-HCl буфер (pH = 2,75); 1 М раствор мочевины в 0,1 М ФБ с 0,15 М NaCl (pH = 7,4); 0,5 М раствор ТСЕР в ФБ и 8 М раствор мочевины в 0,2 М глицин-HCl буфере.

Биологическую активность пептидов исследовали на культуре клеток эпидермоидной карциномы человека HEp2C (Коллекция лаборатории вакциноуправляемых инфекций РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь) с помощью МТТ-теста. В клетки вносили растворы в бессывороточной среде 10 нг/мл синтетического EGF, синтетического EGF D46G, рекомбинантного Met-EGF D46G, а также только бессывороточную среду (контроль).

Для оценки острой токсичности использовали растворы EGF и EGF D46G в стерильном ФБ в дозах 320 мкг/кг (терапевтическая) и 3200 мкг/кг (максимальная). Мышей линии Af разделили на 12 групп (n = 6): интактные самцы; самцы, получавшие стерильный ФБ (контроль); самцы, получавшие

320 мкг/кг EGF; самцы, получавшие 3200 мкг/кг EGF; самцы, получавшие 320 мкг/кг EGF D46G; самцы, получавшие 3200 мкг/кг EGF D46G; и аналогичные группы для самок. В течение 16 суток мышей осматривали с регистрацией показателей состояния организма, на 17 сутки проводили вскрытие животных.

Для оценки активности EGF и EGF D46G в модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) самок мышей линии C57BL/6 разделили на 4 группы: интактные ($n = 12$); мыши, получавшие однократную подкожную инъекцию 6×10^6 клеток АКЭ и стерильный ФБ (контроль) ($n = 20$); мыши, получавшие однократную подкожную инъекцию 6×10^6 клеток АКЭ и EGF в дозе 320 мкг/кг ($n = 20$); мыши, получавшие однократную подкожную инъекцию 6×10^6 клеток АКЭ и EGF D46G в дозе 320 мкг/кг ($n = 20$).

Для получения кроличьих поликлональных антител к EGF D46G использовали два беспородных кролика обоего пола, которых содержали в виварии УО «БГМУ». Дизайн описанных экспериментов на лабораторных животных был одобрен Комиссией по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси и Комитетом по биомедицинской этике УО «БГМУ».

Статистические расчёты проводили с помощью MS Excel и PAST 4.11. Нормальность распределения оценивали по критерию Шапиро–Уилка, данные представляли как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение либо медиана [25-й процентиль; 75-й процентиль]. Статистическую значимость ($p < 0,05$) оценивали с помощью t -критерия Стьюдента либо U -критерия Манна–Уитни.

Дизайн мутантной формы EGF

Согласно алгоритму PentUnFOLD, в неструктурированное состояние могут переходить остатки EGF, контактирующие с I доменом (Ile23, Lys28, Tyr29) и III доменом (Ser9 и Tyr44) его рецептора. Задачей работы являлось нарушение взаимодействия EGF с III доменом EGFR при сохранении его способности связываться с I доменом. Исходя из этого, наиболее подходящим для внесения замен является фрагмент в области Tyr44 четвёртого β -тяжа.

С помощью PentUnFOLD нами было рассмотрено 9 сайтов в С-концевом фрагменте EGF (Cys42–Trp50), в каждом из которых было произведено по 19 аминокислотных замен, что эквивалентно 171 замене. Замена, снижающая вероятность перехода остатка Tyr44 в неструктурированное состояние и удлиняющая четвёртый β -тяж, считалась подходящей. Согласно алгоритму PentUnFOLD, такими свойствами обладают замены остатка Asp46 на Cys, Gly, Ile, Trp, Tyr, Val, среди которых Gly в наименьшей степени снижает растворимость пептида [2–А]. Согласно алгоритму DisEMBL, замена D46G также повышает стабильность С-конца EGF (Ile38–Arg53) [10–А]. Данная

замена не встречалась ни в одной из 86 последовательностей EGF-подобных факторов роста, изученных в филогенетическом анализе [18–А], а также при анализе соматических мутаций в EGF-подобных факторах роста, находящихся под влиянием мутационного АТ-давления [12–А, 14–А, 17–А].

Для оценки влияния замены D46G на межмолекулярные взаимодействия в структуре его комплекса с рецептором проводили моделирование EGF D46G на сервере Swiss-Model с использованием в качестве шаблона структуры EGF (PDB ID 1IVO) и последующим докинггом на сервере ClusPro [8–А]. Согласно результатам анализа с помощью серверов PIC, Prodigy и mCSM-PPI2, замена D46G снижает количество межмолекулярных взаимодействий между лигандом и III доменом EGFR [8–А, 10–А].

Определение порядка олигомеров EGF, EGF D46G и Met-EGF D46G и сравнение устойчивости димеров EGF и EGF D46G к диссоциации

Полосы цитохрома *c*, изображённые на рисунке 1 [2–А, 3–А, 4–А], соответствуют его мономерам (~12 кДа), димерам (~24 кДа), тримерам (~36 кДа) и тетрамерам (~48 кДа) [Hirota S. et al., 2010]. Полосы исследуемых пептидов соответствуют молекулярной массе их димеров: EGF – 12,4 кДа, EGF D46G – 12,3 кДа, Met-EGF D46G – 12,6 кДа [2–А, 4–А]. Димеры пептидов мигрировали дальше, чем мономер цитохрома *c*, поскольку абсолютная величина заряда цитохрома *c* ниже из-за разницы между pI белка и pH буферного раствора [2–А]. Восстановление дисульфидных связей не приводит к образованию олигомеров EGF более высокого порядка (рисунок 1 В) [3–А].

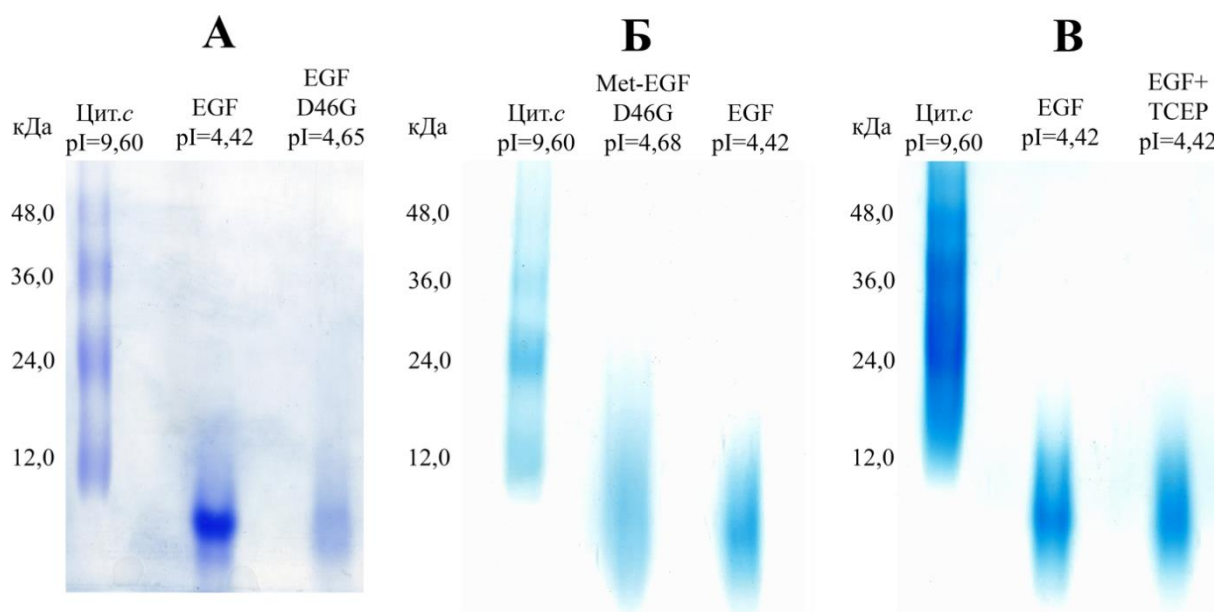


Рисунок 1 – Результаты голубого нативного ПААГ-электрофореза (pH = 7,4):
А — цитохрома *c*, синтетических EGF и EGF D46G; Б — Met-EGF D46G;
В — невосстановленной и восстановленной форм EGF

При 20 °С, рН = 7,4 и концентрации EGF 0,1 мг/мл его мономеры в растворе, прошедшем через мембрану с MWCO 10 кДа, не были обнаружены. При 37 °С сигнал флуоресценции фильтрата при 330 нм составил 4,8 % от интенсивности нефильтрованного раствора, а при 50 °С – 16,3 %, что свидетельствует о температурно-индуцированной диссоциации димеров EGF [2–А, 15–А].

Диссоциация димеров EGF увеличилась при разбавлении: сигнал флуоресценции при 357 нм в фильтрате насыщенного раствора был равен 6,8 % от интенсивности нефильтрованного раствора, а в фильтрате разведения 1/4 – 8,7 %. Разбавление насыщенного раствора EGF буферным раствором с 0,15 М NaCl не вызывало диссоциацию димеров [2–А]. Восстановление дисульфидных связей увеличивало устойчивость димеров к диссоциации: в фильтрате насыщенного раствора EGF мономеры не были обнаружены при 20 °С [3–А].

По сравнению с EGF димеры EGF D46G имеют выраженную устойчивость к разведению и нагреванию: спектры флуоресценции мономеров в разведениях и фильтратах при 20, 37 и 50 °С не были зарегистрированы [2–А]. Восстановление дисульфидных связей в EGF D46G также не приводит к диссоциации его димеров [3–А].

Анализ пространственной структуры EGF, EGF D46G и Met-EGF D46G

Результаты анализа вторичной структуры невосстановленного EGF согласуются с известными данными [Lu H. S. et al., 2001; Ogiso H. et al., 2002; Lu C. et al., 2010; Huang H. W. et al., 2010]. Однако нами было обнаружено, что при нагревании от 35 до 40 °С для EGF характерен структурный переход от β -структуры к петле (англ. *random coil*) с уменьшением количества остатков в β -структуре на 20 % (рисунок 2 А) [2–А, 16–А]. Вероятно, данный переход в растворе при рН = 7,4 и температуре, близкой к физиологической, необходим для формирования сайтов связывания с EGFR [2–А].

Замена D46G увеличивает содержание β -структур в EGF (рисунок 2 В): процент остатков, образующих β -структуру ($37,9 \pm 1,6$ %), усреднённый по всему диапазону, значительно выше ($p < 0,01$), чем процент остатков в α -спиралях ($9,9 \pm 1,1$ %) [2–А, 10–А]. Замена D46G увеличила ригидность полипептидной цепи, поскольку процент остатков, образующих α -спирали и β -структуры, в EGF D46G остаётся стабильным при нагревании [2–А].

Восстановление дисульфидных связей в EGF увеличивает содержание β -структур (рисунок 2 Б): процент их образующих остатков значительно выше ($p = 0,012$) в восстановленном EGF ($33,4 \pm 9,0$ %), чем в невосстановленном ($24,3 \pm 5,1$ %). Восстановление EGF D46G приводит к частичной потере его вторичной структуры при нагревании выше 40 °С (рисунок 2 Г) [3–А].

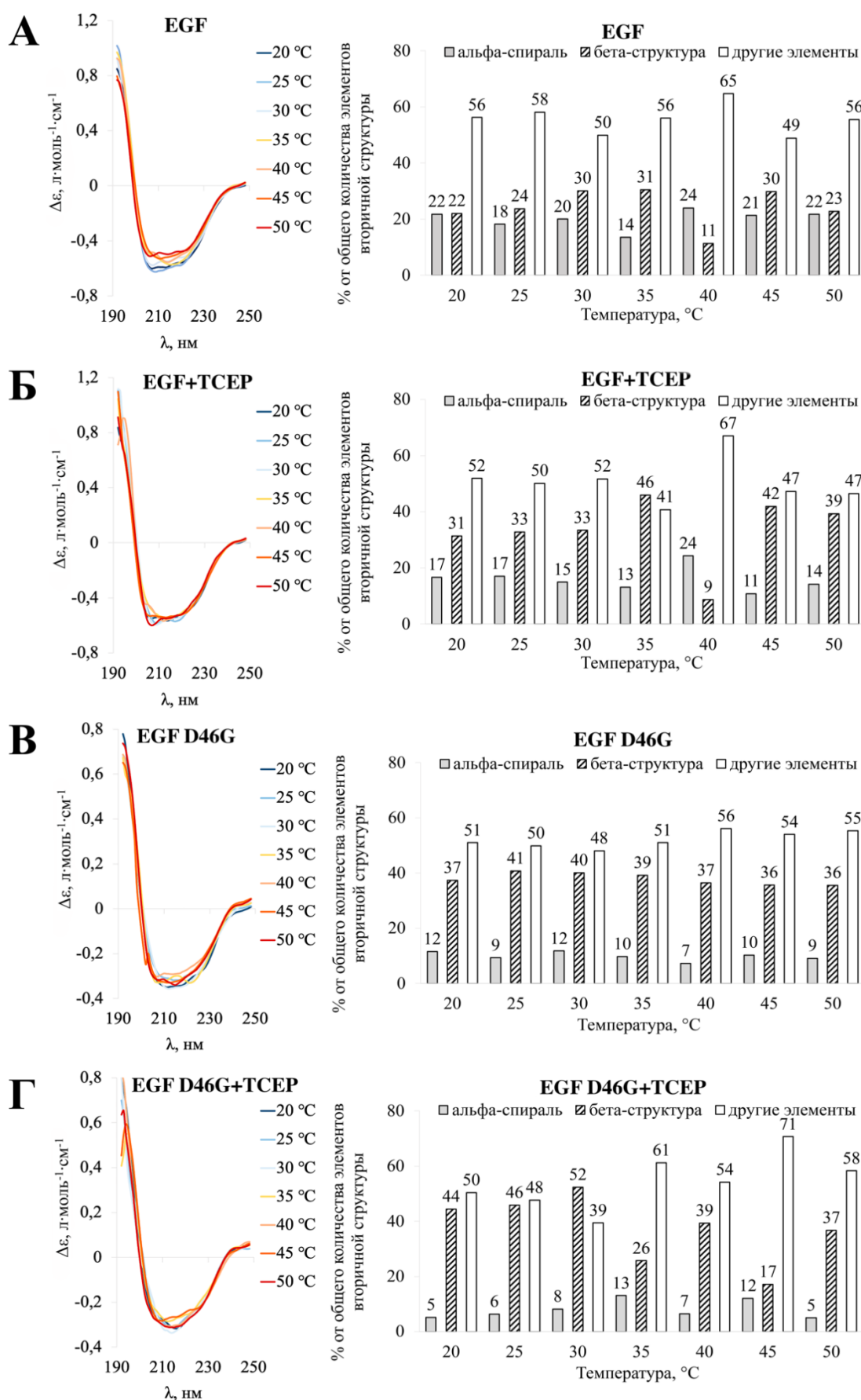


Рисунок 2 – Спектры кругового дихроизма в диапазоне температур от 20 до 50 °C (pH = 7,4) и диаграммы, отражающие содержание вторичных структур:
А — EGF; Б — восстановленный EGF; В — EGF D46G; Г — восстановленный EGF D46G

В спектре ИК НПВО фильтрата раствора EGF присутствуют только два компонента полосы амид I, характерные для α -спиралей (1653 см^{-1}) и β -поворотов (1674 см^{-1}), тогда как в спектре раствора EGF присутствуют полосы, характерные для межмолекулярной (1622 см^{-1}) и антипараллельной (1689 см^{-1}) β -структуры [2–А]. Спектр Met-EGF D46G в нейтрализованном элюате не имеет полос поглощения, соответствующих α -спиралям (1659 – 1650 см^{-1}), однако имеет полосы, характерные для межмолекулярной β -структуры (1620 см^{-1}), β -поворотов (1691 см^{-1}) и петель (1643 см^{-1}) [4–А].

Согласно результатам флуоресцентной спектроскопии, в EGF D46G происходит перенос энергии между С-концевыми остатками Tyr44 и Trp49–Trp50: в отличие от спектров EGF, для его мутантной формы характерна более интенсивная суммарная эмиссия Trp и Tyr ($\lambda_{\text{Ex}} = 280\text{ нм}$), чем эмиссия только Trp ($\lambda_{\text{Ex}} = 295\text{ нм}$) [2–А]. После восстановления дисульфидных связей в EGF и EGF D46G наблюдается увеличение разницы между максимумами возбуждения флуоресценции при 220 и 280 нм, что свидетельствует об отдалении ароматических аминокислотных остатков от основной цепи [11–А].

При нагревании раствора EGF от 20 до 50 °С происходит увеличение интенсивности максимума флуоресценции при 357 нм в сравнении с максимумом при 330 нм, что свидетельствует о переходе С-концевых остатков Trp49 и Trp50 в гидрофильное микроокружение при диссоциации димеров [2–А]. Напротив, микроокружение Trp в EGF D46G и восстановленных формах EGF и EGF D46G гидрофобно, так как выраженный батохромный сдвиг для их спектров не характерен [2–А, 3–А].

Модель EGF D46G, его димера и восстановленных форм пептидов

По результатам спектроскопии была смоделирована пространственная структура EGF D46G, а также EGF и EGF D46G после восстановления дисульфидных связей с помощью сервера I-TASSER с последующей их оптимизацией на сервере 3DRobot. Моделирование полноразмерных димеров EGF и EGF D46G осуществлялось на сервере ClusPro, а их восстановленных форм – с помощью Hex 8.0.0 с использованием структур, полученных в результате предыдущего этапа моделирования. Полученная нами модель димера полноразмерного EGF согласуется с данными о структуре димера его укороченных молекул при pH = 8,1 [Lu H. S. et al., 2001].

На рисунке 3 приведены модели димеров изучаемых пептидов, которые могут наблюдаться в растворе при pH = 7,4 и температуре до 30 °С. В модели димера полноразмерного EGF остаток Tyr44 погружен в короткую межмолекулярную β -структуру, а Trp49–Trp50 экспонированы растворителю в конформационно подвижном С-конце (рисунок 3 А), что затрудняет перенос энергии между данными остатками. Согласно полученным данным, замена

Биологическая активность EGF, EGF D46G и Met-EGF D46G *in vitro*

Согласно результатам аффинной хроматографии, синтетический EGF образует более термоустойчивый комплекс с III доменом EGFR, чем синтетический EGF D46G. Комплексы EGF D46G с III доменом EGFR устойчивы к действию растворов с высокой ионной силой, 1 М раствора мочевины и кислой среды, однако нагревание до 50 °С и добавление TCEP дестабилизирует данные комплексы по сравнению с комплексами EGF [5–А]. Поскольку с III доменом EGFR связывается С-конец EGF [Ogiso H. et al., 2002], из полученных данных видно, что диссоциация димеров EGF и EGF D46G происходит при их контакте с внеклеточным доменом EGFR. При этом мономер EGF D46G образует меньшее количество межмолекулярных взаимодействий с этим доменом, что согласуется с результатами макромолекулярного докинга [8–А].

При внесении пептидов в монослой клеток НЕр2С, сформированный в среде с эмбриональной бычьей сывороткой (FBS) (рисунок 4 А), EGF D46G достоверно ингибировал пролиферацию клеток ($0,897 \pm 0,106$ ед. оптической плотности) по сравнению с EGF ($1,025 \pm 0,080$ ед. оптической плотности) и контролем ($1,052 \pm 0,103$ ед. оптической плотности) ($p = 0,016$ и $0,036$ соответственно).

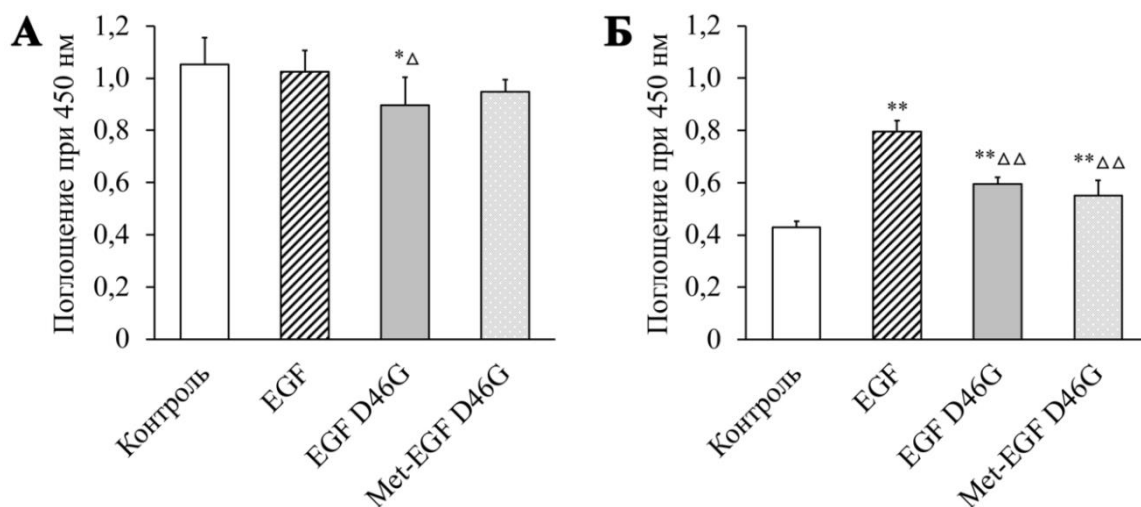


Рисунок 4 – Пролиферация клеток НЕр2С при воздействии синтетических EGF и EGF D46G, а также рекомбинантного Met-EGF D46G:

А — после внесения пептидов в монослой НЕр2С, сформированный в среде с FBS;
Б — после внесения пептидов в суспензию НЕр2С в бессывороточной среде на стадии посева. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n = 16$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ в сравнении с контрольной группой (клетки в бессывороточной среде); $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,001$ в сравнении с группой синтетического EGF согласно *t*-критерию Стьюдента

При добавлении пептидов в суспензию НЕр2С в бессывороточной среде на стадии посева (рисунок 4 Б), EGF достоверно ($p < 0,0001$) стимулировал пролиферацию клеток по сравнению с контролем: $0,796 \pm 0,042$

и $0,430 \pm 0,022$ ед. оптической плотности соответственно. В то же время EGF D46G также достоверно ($p < 0,0001$) стимулировал пролиферацию клеток ($0,595 \pm 0,026$ ед. оптической плотности) по сравнению с контролем, но достоверно ($p < 0,0001$) менее выражено, чем EGF [5–А]. Met-EGF D46G также стимулировал пролиферацию клеток ($0,552 \pm 0,056$ ед. оптической плотности), однако достоверно ($p < 0,001$) менее выражено, чем синтетический EGF [4–А].

Исследуемые пептиды не демонстрируют выраженной агонистической активности в культуре клеток НEr2С, если их монослой был сформирован в условиях среды с FBS (рисунок 4 А), но она проявляется при отсутствии других факторов роста с более высокой аффинностью (рисунок 4 Б) [4–А, 5–А]. Полученные данные подтверждают результаты докинга, согласно которым исследование активности EGF-подобных факторов роста в культуре эукариотических клеток следует проводить в бессывороточной среде, поскольку бычий бетацеллюлин и бычий EGF, содержащиеся в FBS, способны конкурировать с EGF и EGF D46G за связывание с EGFR [9–А].

EGF D46G демонстрирует сниженную агонистическую активность по сравнению с EGF при его добавлении в суспензию клеток НEr2С в бессывороточной среде на стадии посева (рисунок 4 Б). Однако при внесении EGF D46G в монослой НEr2С, сформированный в среде с FBS, данный пептид выступает в качестве антагониста EGFR и снижает пролиферацию клеток НEr2С по сравнению с контролем и группой EGF (рисунок 4 А). Следовательно, синтетический EGF D46G может конкурентно связываться с EGFR в присутствии других EGF-подобных факторов роста и ингибировать пролиферацию опухолевых клеток *in vitro* [5–А].

Биологическая активность EGF и EGF D46G *in vivo*

Подкожное введение синтетических EGF и EGF D46G в дозах 320 мкг/кг (терапевтическая) и 3200 мкг/кг (максимальная) не привело к клиническим изменениям и смерти мышей в течение периода наблюдения. По сравнению с контрольной и интактной группой, в экспериментальных группах наблюдалось статистически значимое снижение массы печени у всех мышей обоего пола, массы тимуса – только у самок [5–А]. Это может быть следствием описанных ранее биологических эффектов регуляторных пептидов, имеющих в своей структуре EGF-подобный домен [Grau M. et al., 1996; Subhan F. et al., 2013], а также более высокой аффинности человеческого EGF и его мутантной формы к EGFR мыши по сравнению с мышинным EGF [8–А, 13–А].

Однократное введение EGF D46G в дозе 320 мкг/кг в стерильном ФБ совместно с клетками АКЭ тормозит формирование солидных опухолей у мышей в течение 7 суток после инъекции (включительно). На 3 сутки после

инъекции суспензии опухолевых клеток в растворе исследуемых пептидов, опухоли были обнаружены у 3 мышей из контрольной группы, у 4 мышей из группы EGF, у 2 мышей из группы EGF D46G. На 5 сутки опухоли развились у 13 мышей из контрольной группы, у 9 мышей из группы EGF и у 3 мышей из группы EGF D46G. На 7 сутки опухоли были обнаружены у 16 мышей из контрольной группы, у 13 мышей из группы EGF, у 10 мышей из группы EGF D46G. На 9 сутки и далее количество мышей с опухолями в группах EGF и EGF D46G оставалось одинаковым [5–А].

Полученные результаты показывают, что EGF D46G является частичным агонистом EGFR по сравнению с нативным EGF – его полным агонистом. Следующие особенности структуры EGF D46G приводят к снижению его агонистических свойств: наличие свободных сайтов связывания с I доменом EGFR и участие его С-концевого фрагмента в межмолекулярном β -листе, что делает взаимодействие с III доменом EGFR менее энергетически выгодным [2–А, 5–А]. При диссоциации EGF D46G до мономеров в результате его контакта с внеклеточными доменами рецептора замена D46G приводит к исчезновению водородных связей и ионных взаимодействий между Asp46 в EGF и His433 (III домен) и Arg53 (I домен) в EGFR [5–А, 8–А]. Таким образом, EGF D46G может предотвращать правильную перестройку доменов EGFR и нарушать процесс аутофосфорилирования рецептора [5–А].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. В 0,01 М фосфатном буфере (pH = 7,4) при температуре 37 °С и концентрации 0,1 мг/мл синтетический EGF с нативной аминокислотной последовательностью существует в виде димеров и мономеров, при этом равновесие между данными формами выражено смещено в сторону димеров. Разбавление раствора и нагревание до 50 °С способствует диссоциации димеров синтетического EGF и сдвигает равновесие в сторону мономеров. Под действием данных факторов в спектрах флуоресценции синтетического EGF происходит батохромный сдвиг: максимум флуоресценции сдвигается с $\lambda_{Em} = 330$ нм до $\lambda_{Em} = 357$ нм, что свидетельствует о переходе С-концевых остатков триптофана (Trp49–Trp50) в более гидрофильное микроокружение в составе мономера. Устойчивость димеров синтетического EGF к разбавлению и нагреванию увеличивается при связывании хлорид-ионов, присутствующих в 0,01 М фосфатном буфере (pH = 7,4) с 0,15 М NaCl. Синтетический EGF с нативной последовательностью претерпевает структурные переходы из β -структурного состояния в состояние с более неупорядоченной структурой при температуре от 35 до 40 °С [1–А, 2–А, 15–А, 16–А].

2. По результатам биоинформационного поиска (филогенетический анализ, анализ соматических мутаций в опухолевых клетках, возникающих под влиянием мутационного АТ-давления, оценка стабильности элементов вторичной структуры, макромолекулярный докинг) предложена единственная аминокислотная замена D46G в EGF, приводящая к снижению его агонистических свойств. Диссоциация димеров синтетического EGF D46G до мономеров не происходит при нагревании до 50 °C, разбавлении раствора и добавлении 0,15 М NaCl. Замена D46G приводит к увеличению содержания β -структуры в составе EGF: она вызывает удлинение и перестройку межмолекулярной β -структуры, что приводит к переходу короткой C-концевой α -спирали в межмолекулярный β -лист. В данном межмолекулярном β -листе EGF D46G происходит перенос энергии между остатками тирозина и триптофана, о чём свидетельствует увеличение интенсивности флуоресценции пептида при возбуждении на длине волны 280 нм в сравнении с таковой при возбуждении на длине волны 295 нм. Замена D46G также увеличивает ригидность полипептидной цепи и предотвращает переход EGF D46G в состояние с бóльшим содержанием аминокислотных остатков в составе петель при температуре от 35 до 40 °C [2–A, 8–A, 10–A, 12–A, 14–A, 17–A, 18–A].

3. Восстановление дисульфидных связей синтетических EGF и EGF D46G приводит к увеличению количества остатков в составе β -структуры в насыщенном растворе пептидов в 0,01 М фосфатном буфере (pH = 7,4), однако это не приводит к образованию ими олигомерных форм более высокого порядка. Увеличение количества остатков в составе β -структуры связано с переходом короткой N-концевой α -спирали Pro7–Asp11 в короткую β -цепь Ser2–Ser4, с удлинением главной β -шпильки EGF-подобного домена, а также с удлинением межмолекулярной β -структуры. Формируемый при восстановлении дисульфидных связей β -тяж (Ser2–Ser4) способен сближаться с C-концевым β -тяжем (Leu47–Arg53) для образования β -структуры из трёх β -тяжей, что приводит к повороту молекул в составе димеров восстановленных форм EGF и EGF D46G и изменению поверхности их контакта. Об этом также свидетельствует увеличение разницы между максимумами возбуждения флуоресценции синтетических EGF и EGF D46G при 220 и 280 нм после восстановления дисульфидных связей, что является следствием менее эффективной передачи энергии, поглощённой пептидными связями, π -системам. Удлинение и реорганизация межмолекулярной β -структуры в результате восстановления дисульфидных связей резко снижает способность димеров восстановленной формы синтетического EGF к диссоциации [3–A, 11–A].

4. Синтетический EGF D46G является частичным агонистом EGFR и эффективно конкурирует с другими пептидами семейства EGF-подобных

факторов роста за связывание с EGFR в условиях *in vitro* и *in vivo*. Синтетические EGF и EGF D46G не вызывают токсических эффектов у мышей линии Af при введении однократных подкожных доз, равных 320 и 3200 мкг/кг, несмотря на их бóльшую аффинность к EGFR мыши по сравнению с мышинным EGF. Синтетический EGF D46G в концентрации 10 нг/мл в бессывороточной среде демонстрирует сниженную агонистическую активность в отношении клеток эпидермоидной карциномы человека по сравнению с синтетическим EGF в той же концентрации. Однако по сравнению с контрольной группой и группой EGF, EGF D46G значительно снижает пролиферацию клеток в их монослое, сформированном в среде с высокоаффинными лигандами EGFR (бычьим бетацеллюлином и бычьим EGF). Однократная подкожная инъекция синтетического EGF D46G в дозе 320 мкг/кг в стерильном 0,01 М фосфатном буфере (pH = 7,4) совместно с клетками асцитной карциномы Эрлиха ингибирует пролиферацию опухолевых клеток и тормозит формирование солидных опухолей у мышей линии C57BL/6 в течение 7 суток после инъекции (включительно) [5–А, 8–А, 9–А, 13–А].

5. Доказана возможность получения мутантной формы EGF с помощью системы бесклеточного синтеза белка. По результатам голубого нативного электрофореза в полиакриламидном геле, рекомбинантный Met-EGF D46G, как и синтетический EGF D46G, существует в растворе преимущественно в виде димеров. Рекомбинантный Met-EGF D46G имеет состав вторичной структуры и проявляет биологические свойства, аналогичные таковым синтетическому EGF D46G: в концентрации 10 нг/мл в бессывороточной среде Met-EGF D46G ингибирует пролиферацию клеток эпидермоидной карциномы человека по сравнению с синтетическим EGF в той же концентрации [2–А, 4–А, 5–А].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Мутантная форма EGF, полученная в настоящей работе, может быть использована для разработки новых соединений, направленных на подавление активности EGFR в опухолевых клетках. Мутантная форма EGF также может быть использована в разработке конъюгированных цитостатиков или токсинов для таргетной терапии опухолей, экспрессирующих EGFR.

2. Получение мутантной формы EGF с помощью системы бесклеточного синтеза белка рекомендовано в качестве альтернативного способа синтеза данного пептида, поскольку его биологическая активность в культуре клеток эпидермоидной карциномы человека и пространственная структура сопоставимы с синтетической мутантной формой EGF, что также доказывает целесообразность доставки гена мутантного EGF в опухолевые клетки с помощью вектора для генной терапии.

3. Синтетический EGF D46G рекомендован для научных исследований в ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» (акт о внедрении от 20.09.2021), практические результаты используются в учебном процессе кафедры общей химии УО «БГМУ» (акты о внедрении от 02.11.2020, 28.09.2021, 11.10.2022).

4. Подход к анализу структуры синтетических пептидов был использован при выполнении задания «Изучить антигенные свойства оригинальных синтетических пептидов для иммунопрофилактики и иммунодиагностики заболеваний, вызываемых парвовирусом В19» ГПНИ «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия» (№ гос. регистрации 20210605, сроки выполнения: 01.01.2021–31.12.2023) [6–А, 7–А] и внедрён в учебный и научный процесс кафедры общей химии УО «БГМУ» (акт о внедрении от 10.12.2024).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых журналах

1–А. Spectra of tryptophan fluorescence are the result of co-existence of certain most abundant stabilized excited state and certain most abundant destabilized excited state / V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, V. V. Poboinev, A. N. Stojarov, L. V. Kordyukova, A. A. Akunevich // *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2021. – Vol. 257, № 119784. – P. 1–13.

2–А. Equilibrium between dimeric and monomeric forms of human epidermal growth factor is shifted towards dimers in a solution / A. A. Akunevich, V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, V. V. Poboinev, N. V. Shalygo, A. N. Stojarov, A. M. Arutyunyan, L. V. Kordyukova, Y. G. Sapon // *The Protein Journal*. – 2022. – Vol. 41, № 2. – P. 245–259.

3–А. Роль дисульфидных связей в формировании пространственной структуры эпидермального фактора роста человека / А. А. Акуневич, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва, Л. В. Кордюкова, А. М. Арутюнян // *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. – 2023. – Т. 68, № 3. – С. 183–196.

4–А. Активность мутантной формы эпидермального фактора роста, полученного с помощью системы бесклеточного синтеза белка / А. А. Акуневич, В. В. Хрусталёв, М. А. Ермолович, В. И. Чепрасова // *Биохимия и молекулярная биология*. – 2023. – Т. 2, № 2(3). – С. 21–27.

5–А. The agonistic activity of the human epidermal growth factor is reduced by the D46G substitution / A. A. Akunevich, V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, M. A. Yermolovich // *Protein & Peptide Letters*. – 2024. – Vol. 31, № 7. – P. 504–518.

6–А. Structural Shifts of the Parvovirus B19 Capsid Receptor-binding Domain: A Peptide Study / V. V. Khrustalev, A. N. Stojarov, A. A. Akunevich, O. E. Baranov, A. V. Popinako, E. O. Samoilovich, M. A. Yermolovich, G. V. Semeiko, E. G. Sapon, V. I. Cheprasova, N. V. Shalygo, V. V. Poboinev, T. A. Khrustaleva, O. V. Khrustaleva // *Protein & Peptide Letters*. – 2024. – Vol. 31, № 2. – P. 128–140.

7–А. Conjugation with the carrier helped to reveal acidification-induced structural shift in the peptide from phospholipase domain of Parvovirus B19 / V. V. Khrustalev, O. V. Khrustaleva, A. N. Stojarov, A. A. Akunevich, O. E. Baranov, A. V. Popinako, E. O. Samoylovich, M. A. Yermolovich, G. V. Semeiko, V. I. Cheprasova, E. G. Sapon, N. V. Shalygo, V. V. Poboinev, T. A. Khrustaleva, B. V. Ranishenka, U. V. Kharytonova, D. Bush // *The Protein Journal*. – 2024. – Vol. 43, № 4. – P. 805–818.

Статьи в сборниках материалов конференций

8–А. Акуневич, А. А. Моделирование комплексов эпидермального фактора роста человека и его формы с аминокислотной заменой D46G с рецепторами человека и мыши / А. А. Акуневич // Актуальные проблемы современной медицины и фармации – 2020 : материалы 74 Междунар. науч.-практ. конф. студентов и молодых учёных, г. Минск, 15–17 апр. 2020 г. / Белорус. гос. мед. ун-т ; редкол.: А. В. Сикорский, В. Я. Хрыщанович. – Минск, 2020. – С. 1019–1024. – 1 CD-ROM.

9–А. Акуневич, А. А. Оценка межмолекулярных взаимодействий между факторами роста эмбриональной бычьей сыворотки и рецептором эпидермального фактора роста культуры клеток HeLa / А. А. Акуневич // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине : сб. науч. тр. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, г. Санкт-Петербург, 3 дек. 2020 г. / СЗГМУ им. И. И. Мечникова ; редкол.: А. В. Силин, Л. Б. Гайкова. – Санкт-Петербург, 2020. – Ч. 1. – С. 19–25.

10–А. Аминокислотная замена D46G увеличивает бета-структурный потенциал эпидермального фактора роста человека / В. В. Побойнев, А. А. Акуневич, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва, А. М. Арутюнян, Л. В. Кордюкова // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине : сб. науч. тр. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, г. Санкт-Петербург, 3 дек. 2020 г. / СЗГМУ им. И. И. Мечникова ; редкол.: А. В. Силин, Л. Б. Гайкова. – Санкт-Петербург, 2020. – Ч. 2. – С. 158–163.

11–А. Акуневич, А. А. Оценка последствий восстановления дисульфидных связей на расположение ароматических аминокислотных остатков в третичной структуре эпидермального фактора роста человека / А. А. Акуневич, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине : сб. науч. тр. 2-й Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, г. Санкт-Петербург, 2–3 дек. 2021 г. / СЗГМУ им. И. И. Мечникова ; редкол.: А. В. Силин, Л. Б. Гайкова. – Санкт-Петербург, 2021. – С. 21–28.

12–А. Колесник, Д. Л. Мутационное давление в генах семейства эпидермального фактора роста / Д. Л. Колесник, А. А. Акуневич // Физико-химическая биология как основа современной медицины : материалы Междунар. науч.-практ. конф., г. Минск, 28 окт. 2022 г. / Белорус. гос. мед. ун-т ; редкол.: В. В. Хрусталёв [и др.]. – Минск, 2022. – С. 111–116. – 1 CD-ROM.

Тезисы докладов

13–А. Акуневич, А. А. Моделирование комплекса эпидермального фактора роста человека и рецептора эпидермального фактора роста мыши / А. А. Акуневич // Актуальные проблемы современной медицины и фармации – 2020 : тез. докл. 74 Междунар. науч.-практ. конф. студентов и молодых учёных, г. Минск, 15–17 апр. 2020 г. / Белорус. гос. мед. ун-т ; редкол.: А. В. Сикорский, В. Я. Хрыщанович. – Минск, 2020. – С. 638. – 1 CD-ROM.

14–А. Акуневич, А. А. Мутационное давление в гене пробелка эпидермального фактора роста человека / А. А. Акуневич, В. В. Хрусталёв // Физико-химическая биология как основа современной медицины : тез. докл. Респ. конф. с междунар. участием, посвящ. 80-летию со дня рождения Т. С. Морозкиной, г. Минск, 29 мая 2020 г. / Белорус. гос. мед. ун-т ; редкол.: А. Д. Таганович, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва. – Минск, 2020. – С. 15–16. – 1 CD-ROM.

15–А. Акуневич, А. А. Олигомерное состояние эпидермального фактора роста человека в растворе / А. А. Акуневич, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва // Физико-химическая биология как основа современной медицины : тез. докл. Междунар. науч. конф., посвящ. 75-летию со дня рождения Е. В. Барковского, г. Минск, 21 мая 2021 г. / Белорус. гос. мед. ун-т ; редкол.: В. В. Хрусталёв, А. Д. Таганович, Т. А. Хрусталёва. – Минск, 2021. – С. 20–22. – 1 CD-ROM.

16–А. Temperature-induced structural transitions in epidermal growth factor / A. A. Akunevich, V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, A. M. Arutyunyan, L. V. Kordyukova, V. V. Poboinev // FEBS Open Bio. – 2021. – Vol. 11, Suppl. 1 [Molecules of Life – Toward New Horizons : proc. of the 45th FEBS Congress, Ljubljana, 3–8 Jul. 2021]. – P. 185.

17–А. Акуневич, А. А. Влияние аминокислотных замен на стабильность элементов вторичной структуры бетацеллюлина / А. А. Акуневич, Д. Л. Колесник // Материалы XXI Конференции молодых учёных, специалистов и студентов, посвящённая 60-летию Института медико-биологических проблем, г. Москва, 20–21 апр. 2023 г. / ГНЦ РФ – ИМБП РАН. – Москва, 2023. – С. 93–94.

18–А. Акуневич, А. А. Филогенетический анализ как этап дизайна частичного агониста рецептора человеческого эпидермального фактора роста / А. А. Акуневич, В. В. Хрусталёв // XI Международная конференция молодых учёных: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов, молекулярных биологов и специалистов фундаментальной медицины : сб. тез., г. Новосибирск, 24–27 сен. 2024 г. / АНО «Инновационный центр Кольцово». – Новосибирск, 2024. – С. 19–20.

РЭЗІЮМЭ

Акуневіч Настасся Аляксандраўна

Атрыманне, структурная характарыстыка і ацэнка біялагічнай актыўнасці эпідэर्मальнага фактару росту з амінакіслотнай заменай

Ключавыя словы: эпідэर्मальны фактар росту, амінакіслотная замена, дымерызацыя, дысульфідныя сувязі, другасная структура, структурны пераход, частковы аганізм, вострая таксічнасць, эксперыментальная мадэль утварэння пухліны

Мэта даследавання: распрацаваць мутантную форму чалавечага эпідэर्मальнага фактару росту з амінакіслотнай заменай, якая зніжае яго аганістычную актыўнасць, і прааналізаваць уплыў гэтай замены на яго прасторавую структуру.

Метады даследавання: біяінфармацыйны аналіз, бясклетачны сінтэз бялку, афінная храматаграфія, натыўны ПААГ-электрафарэз, цэнтрыфужная ультрафільтрацыя, спектраскапія КД, інфрачырвоная спектраскапія, флюарэсцэнтная спектраскапія, МТТ-тэст, даследаванне вострай таксічнасці, мадэляванне соліднай формы асцытнай карцыномы Эрліха.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Удакладнены механізм звязвання EGF з рэцэптарам: у растворы пры $\text{pH} = 7,4$ і тэмпературы ад 35 да 40°C адбываецца частковая страта другаснай структуры ліганда, а дысацыяцыя яго дымераў адбываецца пры кантакце з пазаклеткавымі даменамі рэцэптара. Упершыню прапанавана замена ў становішчы Asp46 С-канцавога фрагмента EGF, якая зніжае яго афіннасць да III дамена EGFR і прыводзіць да зніжэння аганістычнай актыўнасці. Упершыню апісаны ўплыў поўнага аднаўлення дысульфідных сувязяў на фарміраванне прасторавай структуры дымераў сінтэтычнага EGF і EGF D46G: адбываецца павелічэнне колькасці рэшткаў у β -структуры і зніжэнне здольнасці дымераў натыўнага EGF да дысацыяцыі. Упершыню паказана магчымасць атрымання рэкамбінантнай формы мутантавага EGF з дапамогай сістэмы бесклеткавага сінтэзу бялку: прасторавая структура рэкамбінантнага пептыда і яго біялагічная актыўнасць у культуры клетак эпідэрмоіднай карцыномы чалавека супастаўная з адпаведнымі сінтэтычнага EGF D46G.

Рэкамендацыі па прымяненні: EGF D46G можа быць выкарыстаны для распрацоўкі новых малекул, накіраваных на прыгнечанне аберантнай актыўнасці EGFR у пухлінных клетках, у тым ліку кан'югаваных цытастатыкаў для таргетнай тэрапіі пухлін, экспрэсуючых EGFR.

Галіна прымянення: біяхімія, медыцына, біятэхналогія.

РЕЗЮМЕ

Акуневич Анастасия Александровна

Получение, структурная характеристика и оценка биологической активности эпидермального фактора роста с аминокислотной заменой

Ключевые слова: эпидермальный фактор роста, аминокислотная замена, димеризация, дисульфидные связи, вторичная структура, структурный переход, частичный агонизм, острая токсичность, экспериментальная модель опухолеобразования

Цель исследования: разработать мутантную форму человеческого эпидермального фактора роста с аминокислотной заменой, снижающей его агонистическую активность, и проанализировать влияние этой замены на его пространственную структуру.

Методы исследования: биоинформационный анализ, бесклеточный синтез белка, аффинная хроматография, нативный ПААГ-электрофорез, центрифужная ультрафильтрация, спектроскопия КД, ИК-спектроскопия, флуоресцентная спектроскопия, МТТ-тест, исследование острой токсичности, моделирование солидной формы асцитной карциномы Эрлиха.

Полученные результаты и их новизна. Уточнён механизм связывания EGF с рецептором: в растворе при pH = 7,4 и температуре от 35 до 40 °C происходит частичная потеря вторичной структуры лиганда, тогда как диссоциация его димеров происходит при контакте с внеклеточными доменами рецептора. Впервые предложена замена в положении Asp46 C-концевого фрагмента EGF, которая снижает его аффинность к III домену EGFR и приводит к снижению агонистической активности. Впервые описано влияние полного восстановления дисульфидных связей на формирование пространственной структуры димеров синтетического EGF и EGF D46G: происходит увеличение количества остатков в β -структуре и снижение способности димеров нативного EGF к диссоциации. Впервые показана возможность получения рекомбинантной формы мутантного EGF с помощью системы бесклеточного синтеза белка: пространственная структура рекомбинантного пептида и его биологическая активность в культуре клеток эпидермоидной карциномы человека сопоставима с таковыми синтетического EGF D46G.

Рекомендации по применению: EGF D46G может быть использован для разработки новых молекул, направленных на подавление aberrантной активности EGFR в опухолевых клетках, в том числе конъюгированных цитостатиков для таргетной терапии опухолей, экспрессирующих EGFR.

Область применения: биохимия, медицина, биотехнология.

SUMMARY

Akunevich Anastasia Aleksandrovna

Obtaining, structural characterization and evaluation of biological activity of epidermal growth factor with amino acid substitution

Key words: epidermal growth factor, amino acid substitution, dimerization, disulfide bonds, secondary structure, structural transition, partial agonism, acute toxicity, experimental model of tumor formation

The aim of the study: to develop a mutant form of human epidermal growth factor with an amino acid substitution that reduces its agonistic activity and to analyze the effect of this substitution on its spatial structure.

Research methods: bioinformatics analysis, cell-free protein synthesis, affinity chromatography, native PAGE, centrifugal ultrafiltration, CD spectroscopy, IR spectroscopy, fluorescence spectroscopy, MTT test, acute toxicity study, modeling of solid Ehrlich ascites carcinoma.

Obtained results and their novelty. The mechanism of EGF binding to the receptor has been clarified: in solution at pH = 7.4 and temperature from 35 to 40 °C, there is a partial loss of the secondary structure of the ligand, while dissociation of its dimers occurs upon contact with the extracellular domains of the receptor. For the first time, a substitution at the Asp46 position of the C-terminal fragment of EGF has been proposed, which reduces its affinity for EGFR domain III and leads to a decrease in agonistic activity. For the first time, the effect of complete disulfide bond reduction on the formation of the spatial structure of synthetic EGF and EGF D46G dimers has been described: an increase in the number of residues in the β -structure and a decrease in the ability of native EGF dimers to dissociate. For the first time, the possibility of obtaining a recombinant form of mutant EGF using a cell-free protein synthesis system has been demonstrated: the spatial structure of the recombinant peptide and its biological activity in a culture of human epidermoid carcinoma cells are comparable to those of synthetic EGF D46G.

Recommendations for usage: EGF D46G can be used to develop new molecules aimed at suppressing aberrant EGFR activity in tumor cells, including conjugated cytostatics for targeted therapy of tumors expressing EGFR.

Field of application: biochemistry, medicine, biotechnology.

Подписано в печать 26.05.25. Формат 60×84/16. Бумага писчая «PROJECTA Special».
Ризография. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 1,39. Уч.-изд. л. 1,55. Тираж 60 экз. Заказ 362.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 24.11.2023.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.