

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-10

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАК ЭТАП ДИЗАЙНА ЧАСТИЧНОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА
ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА***

**PHYLOGENETIC ANALYSIS AS A STEP OF HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR
RECEPTOR PARTIAL AGONIST DESIGN**

А. А. Акуневич, В. В. Хрусталёв

Белорусский государственный медицинский университет, Минск

A. A. Akunevich, V. V. Khrustalev

Belarusian State Medical University, Minsk

✉ akunevichna@gmail.com

Аннотация

Для EGF подсемейства Bovinae и семейства Cervidae характерно изменение положения остатков Cys в N- и C-концевых фрагментах. C-концевой фрагмент EGF (Glu40–Trp49) является наиболее перспективной областью для внесения аминокислотной замены в ходе дизайна его мутантной формы со сниженной агонистической активностью, поскольку для данного участка характерна наименьшая изменчивость в процессе эволюции.

Abstract

In the EGF structure of the Bovinae subfamily and the Cervidae family, there are changes in the Cys position in the N- and C-terminal fragments. The C-terminal fragment (Glu40–Trp49) is the most promising region for introducing an amino acid substitution during the design of its mutant form with reduced agonistic activity, since this region is characterized by the least variability during the process of evolution.

Для эпителиальных опухолей характерна aberrантная активация EGFR, что способствует пролиферации, ангиогенезу, метастазированию и ингибированию апоптоза опухолевых клеток [1]. В качестве перспективных противоопухолевых агентов, связывающих внеклеточные домены EGFR, рассматриваются его нативные лиганды с измененной аминокислотной последовательностью, которые обладают антагонистической или частичной агонистической активностью [2]. В ходе дизайна мутантной формы EGF необходимо рассмотреть замены, которые еще не наблюдались среди гомологов семейства EGF-подобных факторов роста в сайтах связывания лиганда с рецептором.

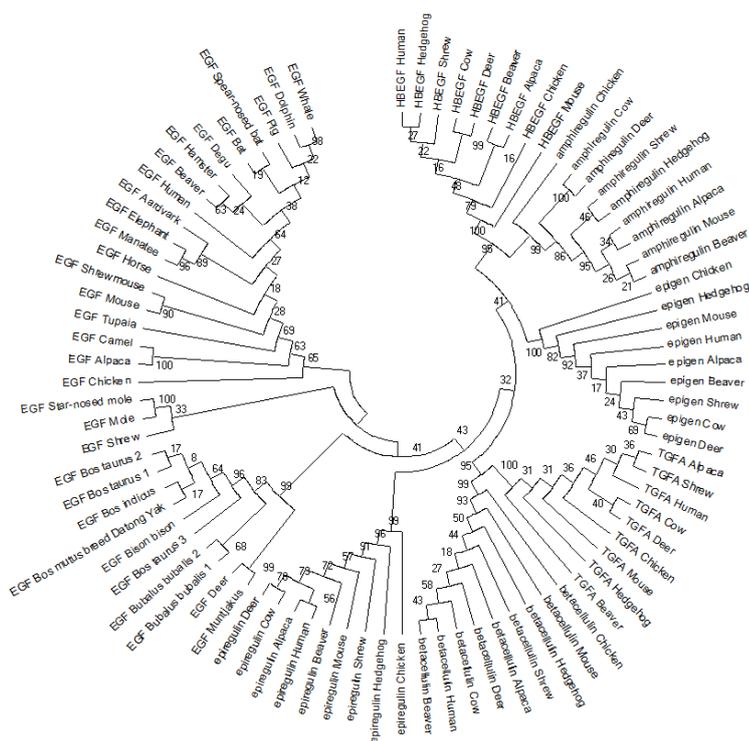
Для филогенетического анализа использовали 32 аминокислотные последовательности EGF и по 9 аминокислотных последовательностей TGF- α , HB-EGF, эпирегулина, эпигена, амфирегулина и бетацеллюлина из баз данных Uniprot, Ensembl и GenBank. Выравнивание последовательностей EGF-подобных факторов роста и построение филогенетического дерева по методу UPGMA на основании эволюционной аминокислотной дистанции JTT осуществлялось в программе MEGA 10. Предсказание порядка образования дисульфидных связей проводилось с помощью алгоритма CysCon [3].

Как видно на рисунке, последовательности EGF подсемейства Bovinae и семейства Cervidae настолько отличаются от EGF остальных млекопитающих, что группируются на общей ветви с другими пептидами семейства EGF-подобных факторов роста.

У всех пептидов семейства EGF-подобных факторов роста млекопитающих сохраняются все 6 остатков Cys в соответствующих положениях EGF-подобного домена, тогда как в последовательностях EGF различных видов быков 1-й остаток Cys находится в 2-м положении, а не в 6-м. Одна из последовательностей EGF *Bubalis bubalis* содержит остаток Cys и в 2-м, и в 6-м положении, а другая — только в 2-м. По всей видимости, в геноме *Bubalis bubalis* сохранилась мутация, которая была характерна для общего предшественника быков: сначала возникло 2 остатка Cys в N-концевом фрагменте EGF, а затем исходный остаток в 6-м положении заместился на Gly у всех остальных видов быков. Тем не менее даже после подобных существенных перестроек EGF *Bos taurus* сохраняет функциональную активность [4]. Согласно алгоритму CysCon, паттерн образования дисульфидных связей в данной структуре также не нарушен: остаток Cys2 образует дисульфидную связь с остатком Cys20,

* Исследование выполнено при поддержке БРФФИ (проект № Б20М-025).

© А. А. Акуневич, В. В. Хрусталёв, 2024



Филогенетическое дерево пептидов семейства EGF-подобных факторов роста человека и животных

Tyr37, Arg41, Gln43 и Leu47 [5]. При этом в ходе филогенеза некоторые из данных остатков могут замещаться на остатки того же класса (например: Ile23 — на Val, Leu, Phe; Leu26 — на Val, Ile, Ala; Tyr37 — на Phe; Leu47 — на Phe, Ile) либо другого класса (например: His16 — на Asn; Leu26 — на Asp; Gln43 — на Glu). Отмеченная эволюционная «гибкость» EGF свидетельствует о возможности структурных перестроек его комплекса с EGFR. Соответственно, все замены, уже произошедшие в структуре EGF разных видов животных, существенно не изменят активность EGF.

По результатам филогенетического анализа, наиболее перспективной областью для внесения аминокислотной замены при дизайне мутантной формы EGF со сниженной агонистической активностью является С-концевой фрагмент пептида (Glu40–Trp49), поскольку данный участок характеризуется наименьшей изменчивостью в процессе эволюции. Исходя из анализа трехмерных структур EGF и его комплексов с EGFR [5], мутантные формы EGF с заменами в данном участке могут влиять как на стабильность его димеров, так и на аффинность к III домену EGFR.

Литература

1. Roskoski R. Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer // *Pharmacological Research*. 2014. Vol. 78. P. 34–74.
2. Panosa C., Tebar F., Ferrer-Batallé M. et al. Development of an epidermal growth factor derivative with EGFR blocking activity // *PLoS One*. 2013. Vol. 8 (7). P. e69325.
3. Yang J., He B. J., Jang R. et al. Accurate disulfide-bonding network predictions improve *ab initio* structure prediction of cysteine-rich proteins // *Bioinformatics*. 2015. Vol. 31. P. 3773–3781.
4. Luo Y., Zhang R., Gao J. et al. The localization and expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in bovine ovary during oestrous cycle // *Reproduction in Domestic Animals*. 2020. Vol. 55. P. 822–832.
5. Ogiso H., Ishitani R., Nureki O. et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains // *Cell*. 2002. Vol. 110 (6). P. 775–787.

а остаток Cys14 — с остатком Cys31. Отсюда следует, что N-конец EGF быков находится в абсолютно отличной конформации от той, которая формируется в случае образования дисульфидной связи Cys6–Cys20 в других пептидах семейства EGF-подобных факторов роста. Помимо этого, в последовательностях EGF *Cervus elaphus* и *Muntiacus muntjak* имеется дополнительный остаток Cys47 на С-конце пептида. Согласно результатам CysCon, данный дополнительный остаток не влияет на порядок образования дисульфидных связей в EGF *Muntiacus muntjak*, однако дополнительная дисульфидная связь Cys42–Cys47 предсказывается в EGF *Cervus elaphus*, в котором Cys33 заменился на остаток Tyr. Такая модификация С-конца пептида также существенно не снизила сродство EGF к EGFR. Вероятно, EGF подсемейства Bovinae и семейства Cervidae приобрел даже большую аффинность к EGFR, чем можно объяснить высокую эффективность использования эмбриональной бычьей сыворотки в выращивании культур клеток.

В структуре EGF наиболее важными для связывания с EGFR остатками являются Tyr13, Leu15, His16, Ile23, Ala25, Leu26,