

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О. В. ПАЛЛАДІНА

**КРИНІНА ОЛЬГА ІГОРІВНА**

УДК 577.112+576.32/36+616-006.6

БІОЛОГІЧНА РОЛЬ ГЕПАРИН-ЗВ'ЯЗУВАЛЬНОЇ ДІЛЯНКИ  
В СТРУКТУРІ ГЕПАРИН-ЗВ'ЯЗУВАЛЬНОГО  
EGF-ПОДІБНОГО ФАКТОРУ РОСТУ

03.00.04 – біохімія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор  
головний науковий співробітник  
відділу молекулярної імунології  
**Колибо Денис Володимирович**,  
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,

**Офіційні опоненти:**

доктор біологічних наук, професор  
**Толстанова Ганна Миколаївна**,  
начальник науково-дослідної частини  
Київського Національного університету  
ім. Тараса Шевченка;

кандидат біологічних наук, старший  
науковий співробітник  
**Хоруженко Антоніна Іванівна**,  
старший науковий співробітник  
відділу сигнальних систем клітини  
Інституту молекулярної біології і  
генетики НАН України.

Захист відбудеться «18» січня 2021 року о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України за адресою: 01054, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (м. Київ, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат розісланий «\_\_» грудня 2020 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук

Карлова Н. П.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

### **Актуальність теми.**

Мітогенні протеїни – представники сімейства епідермальних факторів росту (англ. Epidermal growth factor, EGF) відіграють ключову роль у процесах росту, розвитку, диференціації та міграції клітин. Гепарин-зв'язувальний, подібний епідермальному фактору росту, ростовий фактор (англ. heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF) є типовим представником родини епідермальних факторів росту. HB-EGF є одним з важливих медіаторів регенерації сполучної тканини, розвитку серцевих клапанів, імплантації бластоцисти та інших нормальних фізіологічних процесів (Iwamoto R. et al., 2003, Dao D. T. et. al. 2018). Трансмембранний попередник HB-EGF є рецептором дифтерійного токсину (Mitamura T. et. al., 1995). З біологічною дією секреторної форми HB-EGF асоціюють проблеми, пов'язані з стимулюванням онкогенної трансформації. Цей мітоген бере участь у канцерогенезі через активацію проліферації ракових клітин, їх міграцію та підтримання їх виживання (Ota I. et. al., 2013). Підвищена експресія HB-EGF часто спостерігається в таких онкологічних захворюваннях, як рак яєчників, молочної залози та ін. (Yotsumoto F. et. al., 2008).

HB-EGF виявляє широкий спектр біологічних властивостей, кожна з яких може бути застосована у різних сферах медицини з терапевтичними чи профілактичними цілями. Так, для виявлення функціонально-активних молекул ДТ у сироватці крові хворих на дифтерію широко застосовують імунологічні тести, а HB-EGF може бути використаний в якості основного компоненту імуно-ензимних тест-систем. HB-EGF є ефективним та дієвим засобом для застосування у дерматології, косметології та хірургічній практиці для прискорення регенерації пошкоджених тканин природним шляхом. Також перспективним напрямком є розробка протипухлинної терапії, яка блокувала б надекспресію HB-EGF та його мітогенний вплив на злоякісні клітини.

Характерною особливістю HB-EGF є його здатність взаємодіяти з гепарином та гепаран сульфатом. Гепаран сульфати (ГС), як клас лінійних полісахаридів сімейства глюкозаміногліканів, грають важливу роль у модуляції функціонального стану клітин. ГС розташовані навколо поверхні клітини в межах позаклітинного матриксу, або у вигляді ковалентно поєднаних з протеїнами комплексів, наприклад, гепаран сульфат протеогліканів (ГСПГ). Вважається, що функція ГС полягає в здатності рекрутувати позаклітинні регуляторні сполуки, такі як гормони, цитокіни та фактори росту, визначати їх локалізацію відносно сайтів міжклітинних контактів та рецепторів, та опосередковувати взаємодію між ними.

Наразі в літературі бракує відомостей щодо особливостей внутрішньоклітинного транспорту ДТ чи його похідних, опосередкованого трансмембранною формою HB-EGF, а також секреторного HB-EGF в комплексі з власними рецепторами. Проведення досліджень у цьому напрямку дозволить розширити уявлення про взаємозв'язок між асоціацією HB-EGF з ГСПГ та прояву його характерних функцій в різних фізіологічних процесах. Також ми зможемо

отримати додаткову інформацію щодо можливостей використання НВ-EGF в якості таргетної сполуки відносно агресивних ракових клітин та створити нові лінії клітин, які будуть націлені саме на оцінку ефективності дії таких протипухлинних препаратів.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконана у відповідності з планами наукових досліджень відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. У роботі використані результати досліджень, отримані в рамках бюджетної теми «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» за 2012-2016 рр. Також експериментальні дослідження проводились в рамках наступних програм: «Розробка засобів для інгібування мітогенної активності гепарин-зв'язувального EGF-подібного фактору росту (№ держреєстрації – 0115U003643); проекту науково-дослідної роботи за грантом Президента України докторам наук «Рекомбінантні фрагменти молекули дифтерійного токсину як потенційний засіб протиракової терапії» (№ держреєстрації 0116U006914).

### **Мета і завдання дослідження.**

Метою дисертаційної роботи є дослідження ролі гепарин-зв'язувального домену у структурі НВ-EGF людини для забезпечення біологічної активності ростового фактору, а саме рецепції трансмембранною формою дифтерійного токсину та утворення комплексів його секреторної форми з EGFR і їх подальшої інтерналізації.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити особливості зв'язування та інтерналізації повної та позбавленої гепарин-зв'язувального домену форм рекомбінантного sHB-EGF на моделі клітин аденокарциноми людини з надекспресією EGFR.
2. Створити рекомбінантні похідні трансмембранної форми НВ-EGF з мутаціями, що заміщують позитивно заряджені амінокислоти на аланін в гепарин-зв'язувальному домені для експресії в еукаріотичній системі.
3. Створити клітинну лінію з відсутньою експресією НВ-EGF за допомогою технології CRISPR/Cas9.
4. Дослідити особливості зв'язування та внутрішньоклітинного транспортування рекомбінантних похідних дифтерійного токсину трансмембранною формою НВ-EGF за відсутності асоціації з ГСПГ.
5. Отримати поліклональні антитіла до sHB-EGF та оцінити ефект повної нейтралізації біологічної дії ростового фактору на моделі агресивної ракової клітинної лінії *in vitro*.

### **Об'єкт дослідження.**

Взаємодія НВ-EGF з ГС на поверхні клітини чи в позаклітинному матриксі, опосередкована гепарин-зв'язувальним доменом ростового фактору.

### **Предмет дослідження.**

Молекулярні механізми зв'язування з рецептором чи лігандом та подальшої цитоплазматичної інтерналізації hHB-EGF

### **Методи дослідження.**

При виконанні роботи було використано біохімічні (гель-електрофорез для розділення протеїнів та ДНК, афінна хроматографія для очищення протеїнів), імунологічні (імуноферментний аналіз, Вестерн-блот), мікробіологічні (культивування мікроорганізмів з метою отримання рекомбінантних протеїнів), молекулярно-біологічні (створення нових генетичних конструкцій, отримання стабільних клонів-продуцентів цільових протеїнів, отримання ноукаутної клітинної лінії), оптичні (протокова цитометрія, конфокальна мікроскопія) та методи роботи із культурою клітин евкаріотів (культивування евкаріотичних клітин, МТТ-тест, трансфекція клітин плазмідними ДНК, тест на заростання «подряпини» для оцінки міграції клітин), статистичні (оцінка результатів досліджень).

### **Наукова новизна роботи.**

Було застосовано кількісну оцінку процесу ендоцитозу повнорозмірного sHB-EGF та його вкороченої форми з відсутнім гепарин-зв'язувальним доменом. Вперше було показано, що відсутність взаємодії sHB-EGF з ГС індукуює більш ранню транслокацію ліганд-рецепторного комплексу до цитоплазми та фосфорилування рецептору. Крім цього, нами було створено нові генетичні конструкції, що кодують флуоресцентно-мічені похідні proHB-EGF людини з мутаціями в гепарин-зв'язувальному домені та на їх основі продемонстровано внутрішньоклітинне транспортування похідного дифтерійного токсину.

### **Практичне значення одержаних результатів.**

Дослідження, спрямовані на поглиблення розуміння біологічної дії ростових факторів в процесах онкогенної трансформації, вже тривалий час не втрачають наукової та практичної цінності. Частина експериментів була сфокусована на визначенні ролі взаємодії ростового фактору з ГСПГ, які разом з іншими компонентами екстрацелюлярного матриксу відіграють життєво важливу роль у диференціації, проліферації, виживаності, полярності та міграції клітин. Зумовлений ними внутрішньоклітинний сигналінг, мабуть, є настільки ж важливим, як сигналінг, опосередкований розчинними мітогенами. Отримані дані щодо особливостей інтерналізації та сигналінгу sHB-EGF в залежності від взаємодії з ГСПГ можуть бути корисними при розробці новітніх протипухлинних препаратів. Крім цього, зручною моделлю для контролю направленості дії, ефективності та безпечності таких терапевтичних засобів може стати клітинна лінія з ноукаутом гену HB-EGF, яка була створена для виконання поставлених завдань дисертаційної роботи.

Створені генетичні конструкції, що кодують форми HB-EGF з різними модифікаціями амінокислотного складу, можуть стати в нагоді для отримання

рекомбінантних протеїнів з метою їх використання для конструювання засобів для інгібування токсичної дії ДТ в сироватці крові людей.

Результати дисертаційної роботи можуть бути рекомендовані до використання при підготовці студентів університетів зі спеціальностей «біохімія», «молекулярна біологія», «біотехнологія», «імунологія».

### **Особистий внесок здобувача.**

У процесі виконання дисертаційної роботи автором особисто вибрано та проаналізовано наукову літературу за темою наукового дослідження. Дисертантом, спільно з науковим керівником розроблено програму проведення досліджень, вибрано методи розв'язання поставлених завдань та самостійно, або в деяких випадках спільно з іншими працівниками, виконано представлені у роботі експерименти. Експериментальна частина дисертаційної роботи була виконана здобувачем особисто, за винятком деяких експериментів, що проводились спільно зі співробітниками лабораторії імунобіології відділу молекулярної імунології інституту. Роботи з отримання генетичної конструкції *pEGFP-N1-proHB-EGF* та перевірка утворення флуоресцентно-міченого функціонального ргоHB-EGF евкаріотичними клітинами проведені спільно з к.б.н. Короткевич Н.В. Аналіз впливу рекомбінантних похідних ДТ на ріст поодиноких клітинних колоній здійснений спільно з к.б.н. Манойловим К.Ю. Отримання та характеристика поліклональних антитіл до sHB-EGF людини та оцінка їх блокуючої дії проведено разом з к.б.н. Сіромолотом А.А. Всі результати вищезгаданих досліджень опубліковано у спільних публікаціях. Автор також вдячний співробітникам Інституту к.т.н. Чуніхіну О.Ю. за організацію та допомогу в роботі з протоковим цитофлуориметром, також к.б.н. Лабинцеву А.Ю. та к.ф.-м.н. Карахіму С.О. за підтримку в роботі з конфокальним мікроскопом.

**Апробація результатів досліджень.** Основні положення дисертації були представлені на Конференції-конкурсі молодих учених (Київ, Україна, 2017 р.), 15 конференції «Горизонти в молекулярній біології» (Геттінген, Німеччина, 2018 р.), 11 Парнасівській конференції (Київ, Україна, 2018 р.), 12 Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, Україна, 2019 р.), 16 Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2020 р.)

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 11 робіт, які включають 5 статей у фахових виданнях та тези 6 доповідей на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях та конгресах.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація містить наступні розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати та обговорення досліджень, узагальнення результатів досліджень, висновки та список використаних джерел. Дисертацію викладено на 129 сторінках машинописного тексту і проілюстровано 38 рисунками та 7 таблицями. Список використаної літератури охоплює 95 найменувань.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

В Огляді літератури систематизовано та проаналізовано сучасні уявлення щодо молекулярної структури, функцій, механізмів реалізації біологічної активності HB-EGF та його рецепторів. Більш детально розглянута роль гепарин-зв'язувального домену в процесах реалізації біологічної активності HB-EGF. Наведено інформацію щодо здатності HB-EGF функціонувати як рецептор до дифтерійного токсину. Наприкінці розділу представлено короткий огляд сучасних даних про участь HB-EGF у механізмах злоякісної трансформації клітин, їх виживання та стійкості до протипухлинної терапії. Загалом, в огляді літератури проаналізовано наявні експериментальні дані, що складають теоретичне підґрунтя представленої дисертаційної роботи.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

*Створення генетичних конструкцій, що кодують proHB-EGF з різними мутаціями в гепарин-зв'язувальному домені.* Плазмід *pEGFP-N1* та *pUC19-proHB-EGF* виділяли з клітин *E.coli* штаму DH10B (DE3) методом лужного лізису. Задля внесення необхідних мутацій у гепарин-зв'язувальний домен proHB-EGF людини використовували метод ПЛР-індукованого подовження ділянки перекривання (Heckman K. L. et al., 2007). Оцінку правильності послідовностей фінальних ПЛР-продуктів здійснювали за допомогою рестриктного аналізу за сайтами, які утворювались в ділянках зі внесеними нуклеотидними змінами. Фінальні ПЛР-продукти та плазмід *pEGFP-N1* послідовно обробляли ендонуклеазами рестрикції BamHI та XhoI та об'єднували в єдину генетичну конструкцію лігуванням T4 ДНК-лігазою за «липкими кінцями».

*Експресія рекомбінантних протеїнів.*

Бактеріальну суспензію культивували в стерильному рідкому середовищі LB у співвідношенні 1:40 та нарощували клітини приблизно 2 години при 37°C за умов інтенсивної аерації до досягнення  $OD_{650} \approx 0,5$ . Після цього додавали IPTG до фінальної концентрації 1 mM і проводили інкубацію при 30°C протягом 3-х годин за інтенсивної аерації середовища.

*Твердофазний імуоферментний аналіз.* 96-лункові полістиролові планшети використовували для сорбції антигену, який вносили у необхідних концентраціях у PBS та інкубували протягом ночі при 4°C. Після внесення антигену вільні для сорбції протеїну сайти на планшеті блокували 3%-м розчином знежиреного сухого молока в PBS протягом 1 год при 37°C. Усі наступні компоненти вносили в PBS з додаванням 0,05% Tween-20 (PBS-T) з подальшою інкубацією за аналогічних умов. Після кожного етапу планшети тричі промивали PBS-T. В експерименті з визначення  $K_D$  комплексів рекомбінантних похідних sHB-EGF з рецептор-зв'язувальною В субодиницею дифтерійного токсину (SbB) в якості первинних антитіл використовували комерційні моноклональні антитіла до sHB-EGF людини (1:5000) та антивидові IgG, кон'юговані з лужною фосфатазою (1:10000). Для визначення титру та специфічності отриманих поліклональних антитіл до sHB-EGF людини сироватки вносили у планшети з сорбованими антигенами, починаючи з розведення 1:100. Для детекції зв'язування

поліклональних антитіл використовували видоспецифічні мишачі або кролячі IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому (1:10000).

Наявність пероксидазної мітки виявляли шляхом інкубації протягом 5 хв при 37°C у розчині хромогенного субстрату 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ) за присутності 0,03 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Реакцію зупиняли додаванням 50 мкл 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Білкові комплекси з лужною фосфатазою візуалізували шляхом інкубації в розчині 1 М діетаноламіну (рН 9,8) з хромогенним субстратом рNPP протягом 1 год при 37°C. Реакцію зупиняли додаванням 2М розчину NaOH. Рівень сигналу оцінювали виходячи зі значень оптичної густини при довжинах хвиль 430 нм (ТМБ) та 405 нм (рNPP) за допомогою мікропланшетного рідера.

Константу афінності нормального та мутантних рекомбінантних похідних sHB-EGF людини до SbV ДТ визначали за методом апроксимації до кривої, отриманої в експерименті зв'язування до насичення. Побудову графічних залежностей та необхідні математичні розрахунки проводили у програмному забезпеченні Prism 8 GraphPad.

*Культивування клітин евкаріот.* Клітинні лінії Vero, A431, U937, MDA-MB-231, 3T3, MCF7 та L929a культивували у поживному середовищі DMEM з L-глутаміном, що містило 5% фетальної сироватки великої рогатої худоби, стрептоміцин (100 мг/л), пеніцилін (10 000 U) та амфотерицин В (250 мкг/л) за 5% CO<sub>2</sub> в атмосфері.

*Вестерн-блот та хемілюмінесцентний аналіз.* Вологе перенесення протеїнів із поліакриламідного гелю на нітроцелюлозну мембрану здійснювали у блоттері Bio-Rad. Блокування проводили в 5% розчині БСА в PBS-T протягом 1 год при 37°C. Надалі мембрану інкубували в PBS-T з антитілами до EGFR, її фосфорильованих форм та актину (у розведенні 1:1000) при 4°C протягом ночі. Після цього та наступного етапу від неспецифічно зв'язаних антитіл мембрану відмивали розчином PBS-T тричі по 15 хв за кімнатної температури при інтенсивному струшуванні. Для виявлення специфічних антитіл використовували кон'юговані з пероксидазою хрому антитіла проти імуноглобулінів кроля або миші у розведенні 1:20000 у PBS-T з додаванням 3% БСА.

Проявлення нітроцелюлозної мембрани здійснювали протягом кількох хвилин у розчині 100 мМ Tris-HCl, що містив 0,025% люмінолу, 0,003% кумарової кислоти та 0,035% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, який вносили безпосередньо перед проявленням. Люмінесценцію фіксували на рентгенівській плівці протягом відповідних проміжків часу в залежності від інтенсивності сигналу. Після цього плівку почергово переносили у готові розчини для проявлення та фіксації. Для проведення повторного хемілюмінесцентного аналізу нітроцелюлозну мембрану двічі промивали розчином 0,2 М гліцину (рН 2.0) протягом 1 хв та залишали ще на 30 хв за 37°C при інтенсивному струшуванні. Після цього мембрану двічі промивали розчином PBS-T та повторно блокували.

*Отримання ноукаутної клітинної лінії.* Пошук олігонуклеотидів гайд-РНК був проведений на веб-сайті для дизайну CRISPR (<http://crispr.mit.edu/>). Обрані варіанти gRNA були відпалені та клоновані в плазмідний вектор *pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0* за сайтом Bpīl. Отримані генетичні конструкції *pSpCas9-*



(BB)/gRNA exon1 та pSpCas9-(BB)/gRNA exon2 використовувалась для отримання клітин з ноукаутом гену HB-EGF. Клітини лінії MDA-MB-231 трансфікували плазмідними ДНК в рівних концентраціях реагентом Lipofectamine, згідно з протоколом виробника. Надалі проводили селекцію інкубацією з 1 мкг/мл пуроміцину протягом 3 діб та проводили субклонування. Колонії, отримані з одиничних клітин, переносили в лунки 24-лункового планшета для подальшого аналізу.

*MTT тест.* Клітини 3Т3 нарощували до конфлюентного стану у 96-лункових планшетах. Перед додаванням рекомбінантних протеїнів, клітини промивали PBS та замінювали середовище на безсироваткове. Рекомбінантні протеїни додавали у концентрації 0,5-1 мкг/мл та культивували за стандартних умов протягом відповідних проміжків часу. Надалі, культуральне середовище замінювали на нове із додаванням MTT реагенту (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) у відповідній до рекомендацій виробника концентрації та інкубували протягом 4 год за стандартних умов. Після цього середовище відбирали, додавали буфер для лізису (90 % ДМСО, 0,1 % ДСН) та інкубували 5 хв за умов інтенсивного струшування. Рівень сигналу оцінювали виходячи зі значень оптичної густини при довжинах хвиль 545 нм (тест) та 630 нм (порівняння).

*Трансфікування клітин евкаріот.* Клітини нарощували до конфлюентного стану. В якості трансфікувального реагенту було використано Lipofectamine. Всі маніпуляції проводили згідно з рекомендаціями виробника. Після трансфекції клітини використовували для приготування препаратів для конфокальної мікроскопії.

*Підготовка фіксованих проб для конфокальної мікроскопії.* В експериментах з вивчення ендосомального транспорту повнорозмірної та вкороченої форм sHB-EGF для приготування проб для конфокальної мікроскопії, клітини лінії A431 вирощували на поверхні покривних скелець в планшетах на 24 лунки до конфлюентного стану. Надалі готували дві серії проб: з EGFP-sHB-EGF<sub>84-106</sub> або EGFP-sHB-EGF у концентрації 0,1 мМ. В експериментах з вивчення рецепторної функції proHB-EGF транз'єнтно трансфіковані клітини лінії Vero та MDA-MB-231<sup>HB-EGF(-)</sup> висівали на покривні скельця в кількості, необхідній для отримання низької конфлюентності. Скельця з клітинами інкубували з протеїнами mCherry та mCherry-SbB, які додавали в концентраціях 10 мг/мл для Vero; 0,25 мМ - для MDA-MB-231<sup>HB-EGF(-)</sup>. Проби ретельно перемішували піпетуванням та витримували впродовж серії інтервалів часу при температурі 37°C в ексікаторі за умов підвищеної концентрації CO<sub>2</sub>.

Після завершення інкубації культуральне середовище зливали, а клітини відмивали і проводили фіксацію 5% розчином параформальдегіду в PBS протягом 40 хв при 4°C. Після завершення фіксації, клітини відмивали PBS та дистильованою водою. Покривні скельця монтували до предметних скелець з допомогою середовища для фіксації клітин на основі полівінілового спирту.

Препарати аналізували за допомогою конфокального мікроскопу Zeiss LSM 510 Meta та використовували масляний імерсійний об'єктив Plan-Apochromat

63x/1.4 Oil DIC. Для збудження флуорофору EGFP використовували опромінення із довжиною хвилі 488 нм, mCherry – 543 нм, а для ядерного барвника Hoechst 33342 – 405 нм. Інтенсивність флуоресценції знімалась на довжинах хвиль 500 – 530 нм для EGFP, 560-615 нм для mCherry та 420 – 480 нм для Hoechst 33342. Аналіз та обробку отриманих зображень проводили за допомогою спеціалізованої програми ImageJ – FIJI.

*Приготування проб для протокової цитофлуориметрії.* Перед дослідом еукаріотичні клітини знімали з поверхні пластикового планшету та осаджували шляхом центрифугування за 300 g впродовж 10 хв. Отриманий осад із живих клітин надалі ресуспендували у невеликому об'ємі 1% БСА та 0,02 % NaN<sub>3</sub> в PBS.

Отриманий осад із живих клітин ресуспендували в 200 мкл розчину 1% БСА та 0,02% NaN<sub>3</sub> в PBS та відповідної концентрації флуоресцентних протеїнів і інкубували при температурі 4°C впродовж 30 хв. В досліді з визначення ефектів нейтралізації біологічної активності sHB-EGF клітини забарвлювали протеїнами mCherry або mCherry-sHB-EGF (10 мкг/мл) в комбінації з сироваткою імунізованих або неімунізованих кролів у розведенні 1:100 або 1:500 в 200 мкл розчину 1% БСА та 0,02% NaN<sub>3</sub> протягом 30 хв при 4°C. Аналіз шляхів загибелі клітин з використанням флуоресцентних міток Annexin V – EGFP та пропідій йодиду (propidium iodide, PI) проводився за аналогічною схемою. Після завершення інкубації для відмивання незв'язаних флуорохромів клітини двічі промивали 1 мл 1% БСА та 0,02% NaN<sub>3</sub> в PBS, при цьому осаджуючи клітини за 8000 g протягом 15 сек. Осад ресуспендували в 1 мл 1% БСА та 0,02% NaN<sub>3</sub> в PBS та переносили в пробірки для проточного цитофлуориметра.

Визначення інтенсивності флуоресценції клітин проводили за допомогою проточного цитофлуориметра Coulter Epics XL (Beckman Coulter, США). Інтенсивність флуоресценції клітин знімали за каналом FL1 та FL3. Аналіз та обробку результатів проводили в спеціалізованих програмах для обробки даних з протокового цитофлуориметра Flowing Software та FCS Express.

*Імунізація тварин.* Експресію та очищення рекомбінантного sHB-EGF для імунізації тварин було проведено науково-виробничим підприємством «Єнамін». Для первинної імунізації кролів дозу зі 100 мкг антигену та повним ад'ювантів Фрейнда вводили внутрішньо-м'язово в 1 ділянку та підшкірно в 2-3 ділянки. Мишей імунізували, вводячи у черевну порожнину стабільну емульсію повного ад'юванту Фрейнда з 25 мкг антигену. Друга та третя бустерні ін'єкції проводились аналогічними дозами антигену в комбінації з неповним ад'ювантом Фрейнда з інтервалами в 2 тижні. Через тиждень після останньої імунізації для отримання сироватки у мишей відбирали кров із хвостової вени, а у кролів – з вушної вени.

Кров без додавання антикоагулянтів витримували протягом 40 хв при кімнатній температурі і центрифугували 30 хв при 2700 g. З метою інактивації термолабільної системи комплементу отримані сироватки нагрівали до 56°C та інкубували протягом 30 хв. Рівень специфічних антитіл до sHB-EGF визначали методом імуно-ензимного аналізу (ІЕА).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ОБГОВОРЕННЯ

**1. Дослідження ролі гепарин-зв'язувального домену у функціонуванні секреторного sHB-EGF людини.**

Біологічна активність sHB-EGF реалізується через рецептори EGFR і ErbB-4 і важливим завданням було оцінити рівень експресії цих типів EGF-рецепторів на клітинах різних ліній.

За результатами проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл, специфічних до рецепторів EGFR і ErbB-4 було встановлено, що загальний рівень цих рецепторів був низьким у клітин ліній L929a, Vero і високим у клітин ліній 3T3 та A431 (рис. 1А). У клітин 3T3 рецептори EGFR і ErbB-4 визначались приблизно в однаковій кількості, а у клітин A431 значно переважав рецептор EGFR (98%) (рис. 1Б).

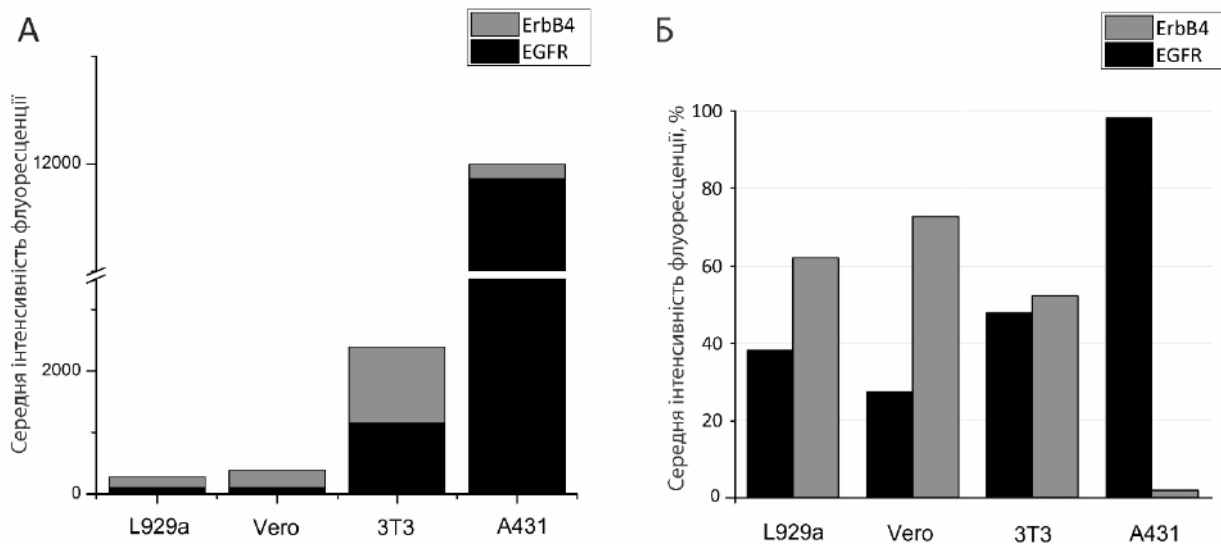


Рис. 1. Кількість і співвідношення рецепторів EGFR та ErbB-4 на поверхні клітин ліній L929a, Vero, 3T3 і A431, визначені за допомогою вимірювання інтенсивності флуоресценції клітин, забарвлених моноклональними антитілами проти рецепторів EGFR та ErbB-4: А – абсолютні значення інтенсивності флуоресценції (умовні одиниці); Б – відносні значення інтенсивності флуоресценції, виражені у відсотках.

Для проведення експериментальних досліджень були використані отримані раніше в нашій лабораторії генетичні конструкції на основі експресійного вектору *pET28a(+)*, що кодують повнорозмірну та вкорочену форми sHB-EGF людини злиті з підсиленим зеленим флуоресцентним протеїном. Експресія злитих протеїнів здійснювалась клітинами *E.coli* штаму Rosetta.

Для визначення здатності похідних sHB-EGF специфічно взаємодіяти з рецепторами на клітинній поверхні, було обрано клітинну лінію A431. Вона є зручною моделлю для вивчення біологічних ефектів sHB-EGF, оскільки характеризується значною надекспресією EGFR. Кінетичну залежність

зв'язування повнорозмірної та вкороченої форм sHB-EGF з його рецепторами було досліджено з використанням проточної цитометрії.

Було виявлено, що інтенсивність флуоресценції клітин, забарвлених повнорозмірним sHB-EGF, вдвічі перевищує інтенсивність флуоресценції клітин, забарвлених вкороченою формою sHB-EGF (рис. 2). Різниця у значеннях може вказувати на більшу кількість сайтів зв'язування для EGFP-sHB-EGF, тому їх насичення відбувається при більш високій концентрації протеїну. Цей факт можна пояснити взаємодією повнорозмірної форми sHB-EGF як з EGFR через EGF-подібний домен, так і за рахунок зв'язуванням з ГСПГ, які представлені на плазматичній мембрані евкаріотичних клітин.

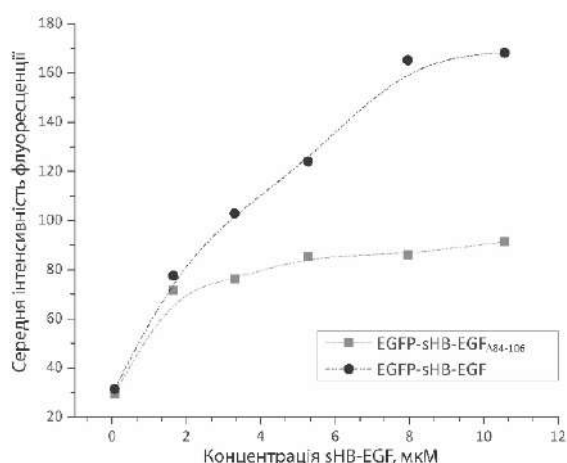


Рис. 2. Залежність інтенсивності флуоресценції клітин A431 від концентрації рекомбінантних EGFP-sHB-EGF $\Delta$ 84-106 та EGFP-sHB-EGF. Точки на графіку відповідають експериментальним даним, отриманим на проточному цитофлуориметрі.

Виявлення, як відсутність гепарин-зв'язувального домену в структурі sHB-EGF може впливати на динаміку його внутрішньоклітинного транспорту, було проведено за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Клітини A431 обробляли еквімолярними концентраціями EGFP-sHB-EGF або EGFP-sHB-EGF $\Delta$ 84-106 та інкубували протягом визначених проміжків часу. При обстеженні зразків методом конфокальної мікроскопії було проаналізовано ефективність зв'язування обох форм фактору росту та формування ендосом.

Як видно з рис. 3А, після першої стадії інкубації з EGFP-sHB-EGF та EGFP-sHB-EGF $\Delta$ 84-106, обидва протеїни зв'язувались з рецепторами клітинної мембрани та транспортувались до цитоплазми у вигляді ендосом через 15 хв від початку інкубації. Слід зазначити, що процес ендцитозу був більш інтенсивним для вкороченої форми sHB-EGF. Відсутність взаємодії з ГСПГ, що опосередковує гепарин-зв'язувальний домен, може бути причиною більш ранньої інтерналізації EGFP-sHB-EGF $\Delta$ 84-106 і призводити до більш швидкого поглинання фактору росту клітинами.

За допомогою програми для обробки зображень Fijі було обчислено загальну кількість ендосом та їх середній розмір для кожного зображення. Очевидно, що кількість ендосом збільшувалась з часом для обох досліджуваних протеїнів (рис. 3Б). Повнорозмірна форма sHB-EGF транспортувалась у цитоплазму пізніше і утворювала меншу кількість ендосом, порівняно з EGFP-sHB-EGF $\Delta$ 84-106 протягом усього періоду дослідження.

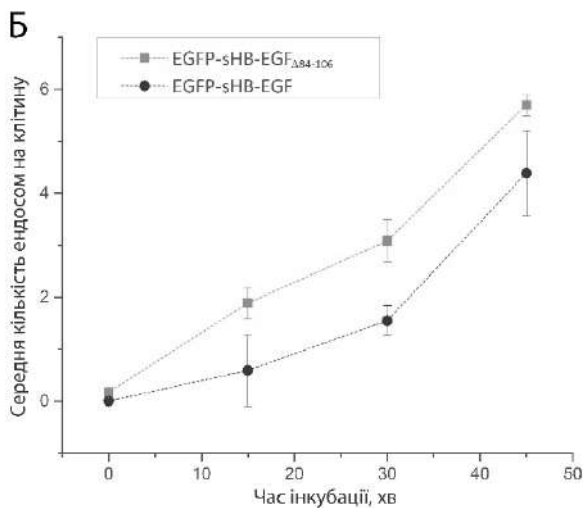
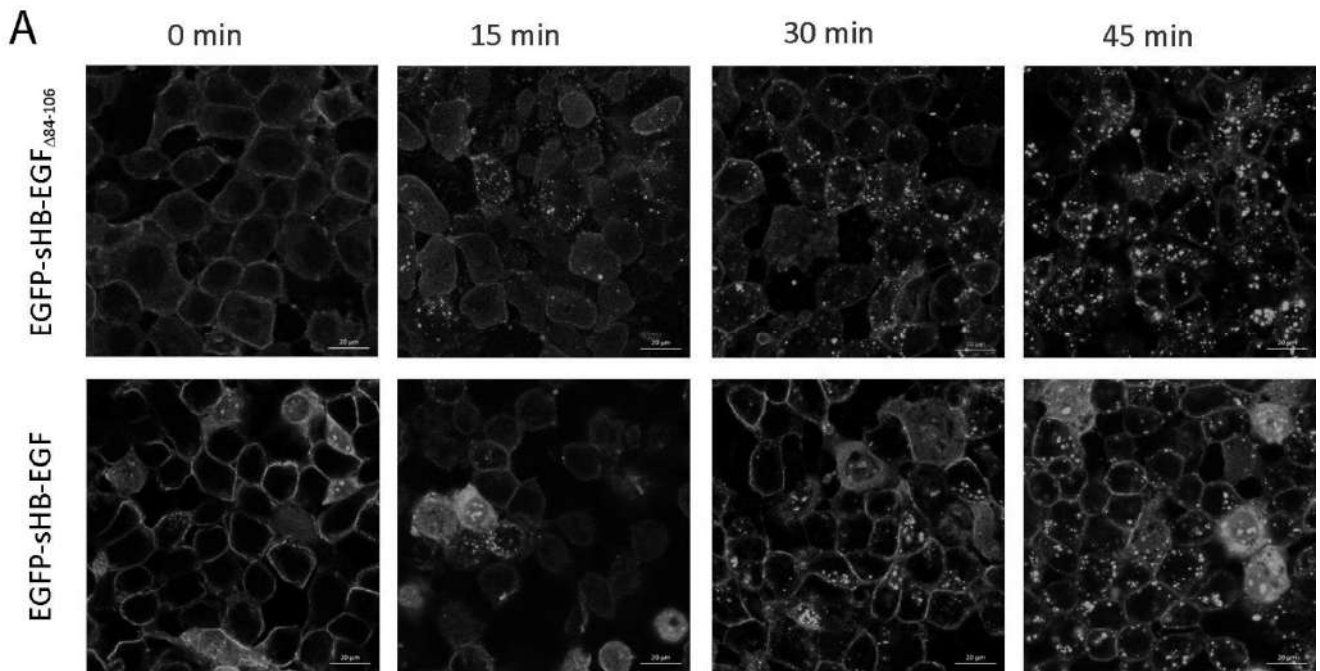


Рис. 3. А - конфокальні знімки фіксованих препаратів клітин А431, забарвлених рекомбінантними EGFP-sHB-EGF та EGFP-sHB-EGF $\Delta_{86-104}$  протеїнами протягом серії проміжків часу. Шкала на знімках відповідає 20 мкм. Б - динаміка зміни кількості ендосом у поперечному оптичному зрізі клітин лінії А431 після інкубації еквімолярними концентраціями EGFP-sHB-EGF та EGFP-sHB-EGF $\Delta_{84-106}$ , отримані з використанням програмного забезпечення Fіjі.

Відомо, що ГСПГ часто виступають в якості ко-рецепторних молекул, які сприяють утворенню стійкого комплексу ліганд-рецептор і можуть регулювати особливості фосфорилування сигнальних кіназ. Таким чином, гепарин-зв'язувальний домен HB-EGF може опосередковувати швидкість формування стійкого комплексу з EGFR та визначати динаміку його фосфорилування.

Для перевірки цієї тези клітини лінії А431 інкубували з повнорозмірною або вкороченою формою рекомбінантного sHB-EGF протягом визначених інтервалів часу. Надалі клітини лізували та досліджували кількість фосфорильованої форми EGFR за допомогою вестерн-блот аналізу (рис. 4). Нами було підтверджено, що обидві форми sHB-EGF здатні індукувати активацію EGFR, проте особливості перебігу цього процесу відрізняються. Так, взаємодія EGFR з EGFP-sHB-EGF $\Delta_{84-106}$  призводить до більш швидкої активації рецептору, проте з плином часу кількість фосфорильованої форми стабільно зменшується. Повнорозмірна форма

sHB-EGF спричиняє більш стабільну активацію EGFR, про що свідчить високий рівень сигналу люмінесцентної мітки на блоті на 40 хв інкубації.

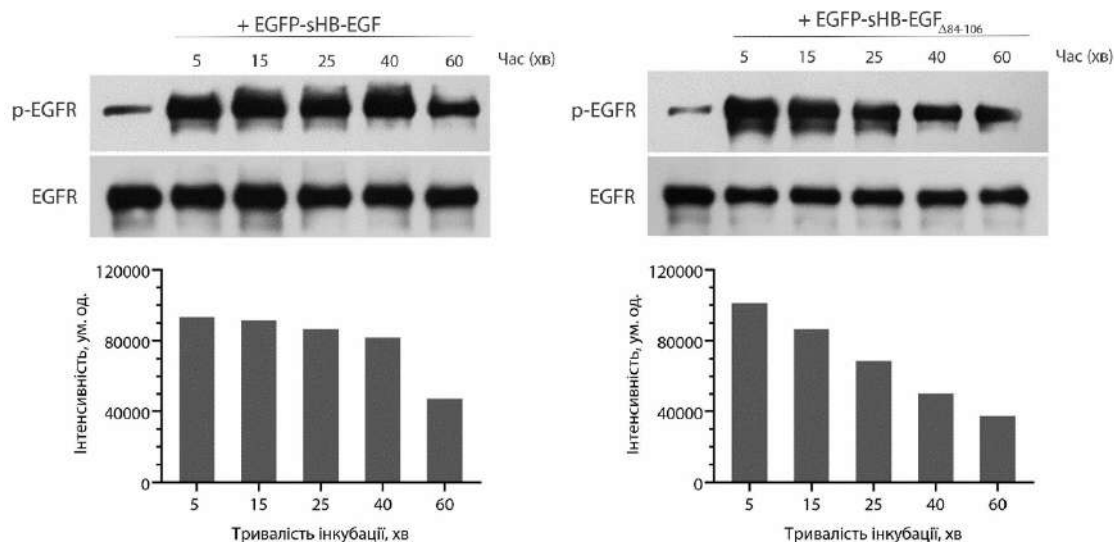


Рис. 4. Вплив різних форм sHB-EGF на активацію EGFR у клітинах лінії A431.

Отримані дані узгоджуються з попередніми результатами щодо меншої інтенсивності транслокації EGFP-sHB-EGF до цитоплазми порівняно з вкороченою формою sHB-EGF. Таким чином, саме взаємодія з ГСПГ є відповідальною за пролонговане формування стабільного комплексу з EGFR та потужну і стабільну активацію рецептору.

## 2. Роль гепарин-зв'язувального домену HB-EGF в процесі рецепції похідних дифтерійного токсину

*Створення та перевірка генетичних конструкцій, що кодують різні форми HB-EGF для вивчення рецепторної функції ростового фактору.*

Для дослідження особливостей інтерналізації рецепторних молекул у комплексі з їх лігандами зручним підходом є створення протеїнів, злитих з репортерними флуоресцентними молекулами. Нами було створено генетичну конструкцію на основі вектору *pEGFP-N1*, що кодує proHB-EGF, злитий з EGFP. З метою функціональної характеристики одержаного протеїну proHB-EGF-EGFP було проведено трансфекцію клітин лінії Vero. З використанням конфокальної мікроскопії встановлено, що клітини експресують активну форму proHB-EGF-EGFP, що здатна утворювати ліганд-рецепторний комплекс з флуоресцентним похідним рецептор-зв'язувальної B субодиниці дифтерійного токсину – mCherry-SbB та інтерналізувати його до цитоплазми.

Дієвим підходом для блокування взаємодії proHB-EGF з ГСПГ на плазматичній мембрані клітин є заміна позитивно-заряджених амінокислот, які відповідальні за цю взаємодію. Нами було створено 2 генетичні конструкції на основі вектору *pEGFP-N1*, що кодують флуоресцентно-мічений proHB-EGF з

різними мутаціями в гепарин-зв'язувальному домені (рис. 5). Мутагенез ДНК було здійснено за допомогою методу ПЛР-індукованого подовження ділянки перекривання.

HB-EGF <sub>(mut)</sub>	80	PQALATPNKEEENGA AAAAAGAGLGA AADPCLRKYKDFCIHGE	120
HB-EGF <sub>(norm)</sub>	80	PQALATPNKEEEN GK R K K K G K G L G K K R D P C L R K Y K D F C I H G E	120
HB-EGF <sub>(del)</sub>	80	PQALATPNK-----LDICLRKYKDFCIHGE	104
		*****	* *****

Рис. 5. Мутації позитивно-заряджених лізину та аргініну в гепарин-зв'язувальному домені proHB-EGF. Незмінена амінокислотна послідовність proHB-EGF наведена у рядку HB-EGF<sub>(norm)</sub>. Делеції амінокислот позначені знаком «-».

Для попередньої перевірки розроблених рекомбінантних протеїнів нами було створено генетичні конструкції на основі вектору *pGEX-4T-1*, що кодують sHB-EGF з мутаціями гепарин-зв'язувальному домені для експресії в прокаріотичній системі експресії. Ці плазміди дозволили нам отримати похідні sHB-EGF, злиті з глутатіон-S-трансферазою, та очистити їх за допомогою афінного сорбенту - глутатіон агарози.

Для підтвердження збереження мutowаними похідними HB-EGF функціональної активності та здатності до рецепції природного ліганду нами було проведено непрямий імуоферментний аналіз. В якості антигену нами було обрано рекомбінантне похідне ДТ – SbB. На основі отриманих результатів нами було побудовано кінетичні криві, зображені на рис. 6. На їх основі показано, що отримані мутантні похідні специфічно взаємодіють з SbB. та розраховано константи афінності з застосуванням нелінійного регресійного аналізу відповідно до гіперболічної функції, що описує класичну специфічну ліганд-рецепторну взаємодію. Було виявлено, що рекомбінантне похідне з делецією гепарин-зв'язувального домену має найменше значення константи афінності  $K_a = 2,05 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ , порівняно з нормальною формою sHB-EGF ( $K_a = 5,67 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). Заміна позитивно-заряджених амінокислотних залишків на аланін також призвела до зменшення афінності взаємодії sHB-EGF та похідного його природного ліганду, проте різниця в значеннях константи афінності є меншою ( $K_a = 3,58 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). Таким чином, максимальне збереження амінокислотного складу є вдалим підходом для створення мутантних похідних для дослідження рецепторної ролі HB-EGF.

#### *Підбір експериментальної клітинної моделі.*

Два варіанти клітинних ліній раку молочної залози - MDA-MB-231 та MCF-7 було проаналізовано на чутливість до дії різних рекомбінантних похідних ДТ методом дослідження росту поодиноких колоній. Було показано, що CRM197 та SbB більш ефективно пригнічували ріст колоній клітин MDA-

MB-231. Отже, HB-EGF є важливим ростовим фактором, що задіяний у процесах проліферації та міграції клітин лінії MDA-MB-231. Це робить її вдалою моделлю для створення клітинних ліній зі зміненим рівнем експресії HB-EGF.

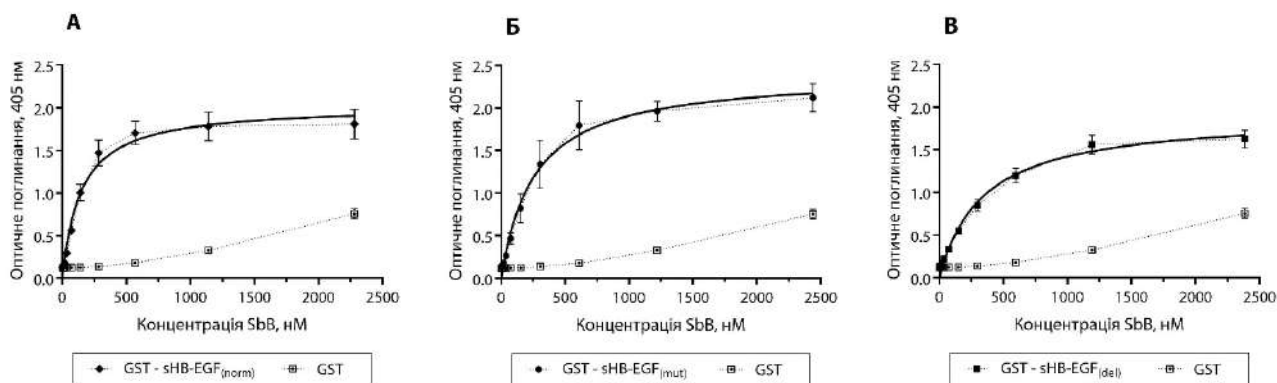


Рис. 6. Графіки залежності зв'язування різних форм sHB-EGF субодиницею В ДТ. Точки на графіку представляють експериментальні дані, отримані в результаті проведення непрямого ІФА ( $M \pm SD$ ). Лінії на графіку показують апроксимацію точок на криві функції, що описує ліганд-рецепторну взаємодію за одним сайтом зв'язування.

#### *Створення клітинної лінії з ноукаутом гену HB-EGF та її характеристика.*

На першому етапі нами було проведено дизайн компонентів для створення генетичних конструкцій для здійснення ноукауту гену proHB-EGF. В результаті було обрано дві послідовності gRNA, що знаходяться у першому та третьому екзонах гену HB-EGF. В результаті було створено генетичні конструкції на основі вектору *pSpCas9(BB)-2A-Puro* з бажаними фрагментами gRNA. З метою отримання клітинної лінії з відсутністю синтезу proHB-EGF клітини лінії MDA-MB-231 трансфікували плазмідами, після чого проводили селекцію антибіотиком пуроміцином та субклонування.

Пошук колоній клітин MDA-MB-231 з ноукаутом гену HB-EGF було оцінено за зв'язуванням клітинами mCherry-SbV. Серед великої кількості протестованих колоній було виявлено різні популяції клітин (рис. 7A), серед яких виділено сублінію клітин MDA-MB-231<sup>HB-EGF(-)</sup> (на рис. 7A позначено як clone III-A5), інтенсивність флуоресценції якої після інкубації з mCherry-SbV майже не відрізнялась від незабарвленої контрольної проби.

Для підтвердження успішності здійсненого ноукауту гену HB-EGF отримані клітинні лінії інкубували у середовищі з 0,1 мкг/мл нативного ДТ протягом 24 год та оцінювали їх стан. На рис. 7Б можна побачити, що додавання токсину до середовища спричиняло повну затримку проліферації клітин та погіршувало їх загальний стан, порівняно з MDA-MB-231<sup>HB-EGF(-)</sup>, які продовжували нормально функціонувати під час подальшої культивування.



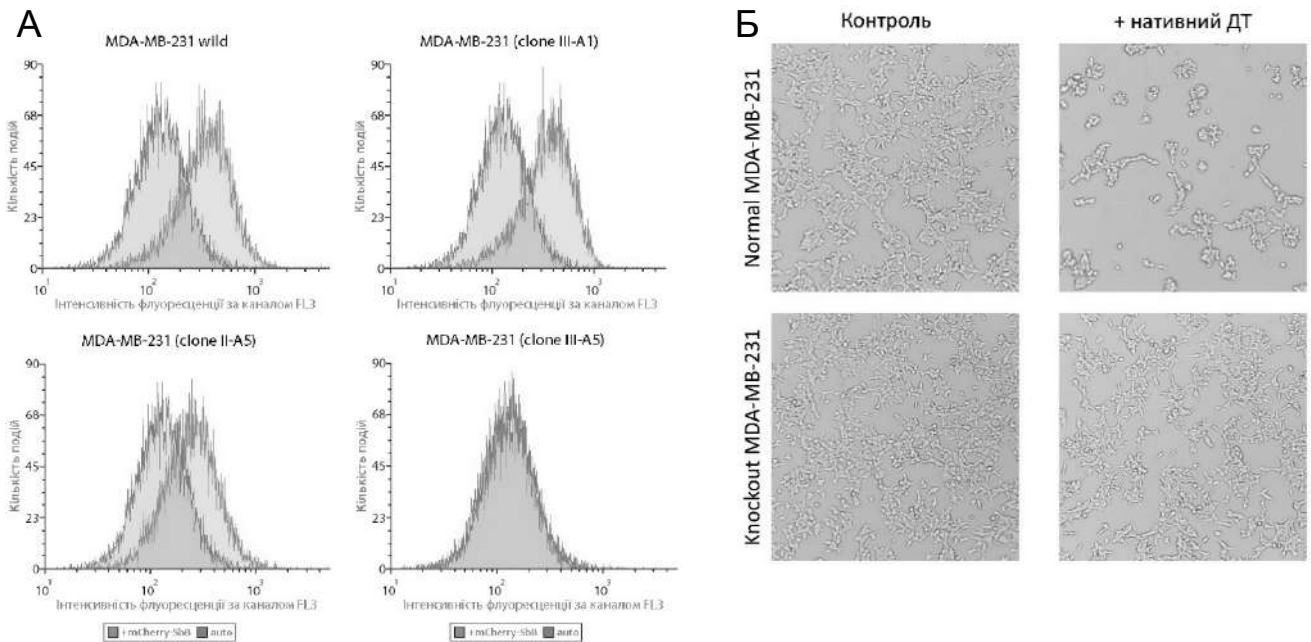


Рис. 7. А - порівняльні гістограми інтенсивності флуоресценції різних колоній клітин лінії MDA-MB-231, забарвлених mCherry-SbV. Б - фотографії субліній клітин MDA-MB-231 з наявною експресією та ноукаутом HB-EGF, зроблені за допомогою інвертованого світлового мікроскопа. З правого боку – клітини після 24 год інкубації з нативним ДТ, з лівого боку – контрольні клітини.

Оцінку проліферативного потенціалу сублінії MDA-MB-231<sup>HB-EGF(-)</sup> та її порівняння з вихідною клітинною лінією здійснювали за допомогою МТТ-тесту. Було показано, що відсутність експресії HB-EGF не призводила до статистично достовірного інгібування процесів росту та життєдіяльності клітин (рис. 8А). Також було досліджено мітогенний ефект природного sHB-EGF, що виділявся в поживне середовище при проведенні спів-культивування з клітинами U937, з використанням проникних тільки для розчинних факторів мембран, на сукупний проліфераційний та метаболічний потенціал обох субліній MDA-MB-231. Виявлено статистично достовірне зниження інтенсивності проліферації та метаболічних процесів для клітин MDA-MB-231<sup>HB-EGF(-)</sup>, проте різниця між кількісними значеннями, отриманими для контрольних і оброблених зразків, не була яскраво вираженою (рис. 8Б).

Для порівняння міграційного потенціалу клітин MDA-MB-231 дикого типу та сублінії MDA-MB-231<sup>HB-EGF(-)</sup> було проведено тест на заростання подряпини. Площу подряпин оцінювали з використанням спеціалізованого плагіну FIJI MRI Wound Healing Tool з подальшим аналізом отриманих значень у GraphPad Prism 8 (рис. 8В). Було виявлено, що за 24 год площа подряпини моношару клітин MDA-MB-231<sup>HB-EGF(-)</sup> була меншою майже на 20% порівняно з клітинами MDA-MB-231 дикого типу. Таким чином, HB-EGF може впливати на міграційний потенціал клітин лінії MDA-MB-231.

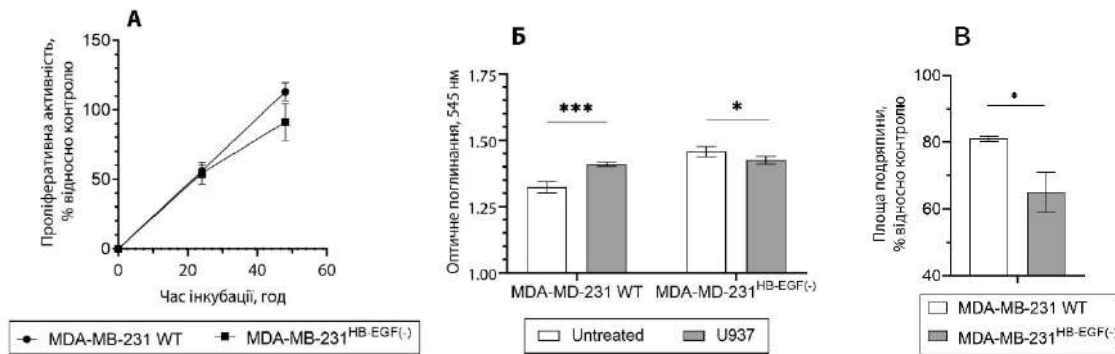


Рис. 8. А - оцінка проліферативного і метаболічного потенціалу нормальної та ноукаутної субліній MDA-MB-231. Б - мітогенна активність природного sHB-EGF, що виділявся клітинами U937 при спів-культивуванні з використанням проникних тільки для розчинних факторів мембран, по відношенню до різних субліній MDA-MB-231. В – зміна нормалізованих відносно контролю значень площі подряпини. На рисунку позначені статистично достовірні за t-критерієм Стьюдента відмінності: \* –  $p < 0,05$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  ( $n = 4$ ).

*Визначення ролі взаємодії proHB-EGF з ГСПГ на клітинній моделі в процесі рецепції похідного ДТ.*

Ми використали ноукаутну сублінію MDA-MB-231<sup>HB-EGF(-)</sup>, для трансфекції генетичними конструкціями, що кодують флуоресцентно-мічені нормальну та мутантну форми proHB-EGF. На рис. 9 приведені результати конфокальної мікроскопії клітин MDA-MB-231<sup>HB-EGF(-)</sup>, що експресували на своїй поверхні EGFP-proHB-EGF або EGFP-proHB-EGF<sub>(mut)</sub>. На 15 хв інкубації з mCherry-SbV спостерігалось утворення ліганд-рецепторних комплексів на поверхні клітини та їх подальша інтерналізація, про що свідчать дані співлокалізації флуоресцентних міток. При тривалій інкубації можна було спостерігати ендосомальний внутрішньоклітинний транспорт mCherry-SbV.

Отримані популяції трансфікованих клітин MDA-MB-231<sup>HB-EGF(-)</sup> використовувались для приготування проб для протокової цитофлуориметрії з метою визначення ролі гепарин-зв'язувальної ділянки в процесі рецепції похідного ДТ.

Для розрахунку константи дисоціації різних форм ростового фактору для кожної з проб визначали середні значення інтенсивності флуоресценції. Отримані значення використовувались для побудови графіків залежності інтенсивності флуоресценції клітин, що експресують нормальну або мутантну форму proHB-EGF, від концентрації доданого ліганду. Для визначення константи було застосовано підхід на основі нелінійного регресійного аналізу з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism. Виявлено, що комплекс SbV з мутантною формою proHB-EGF мав менше значення  $K_d$ ,

порівняно з нормальною формою (таблиця 1). Таким чином, заміна позивно-заряджених амінокислот в гепарин-зв'язувальному домені призвела до незначного збільшення спорідненості SbB до proHB-EGF. З цього можна зробити висновок, що відсутність взаємодії proHB-EGF з поверхневими ГСПГ впливає на конформацію молекули ростового фактору або робить сайт зв'язування в EGF-подібному домені більш доступним, що, в результаті, призводить до утворення більш стійкого комплексу з похідним ДТ.

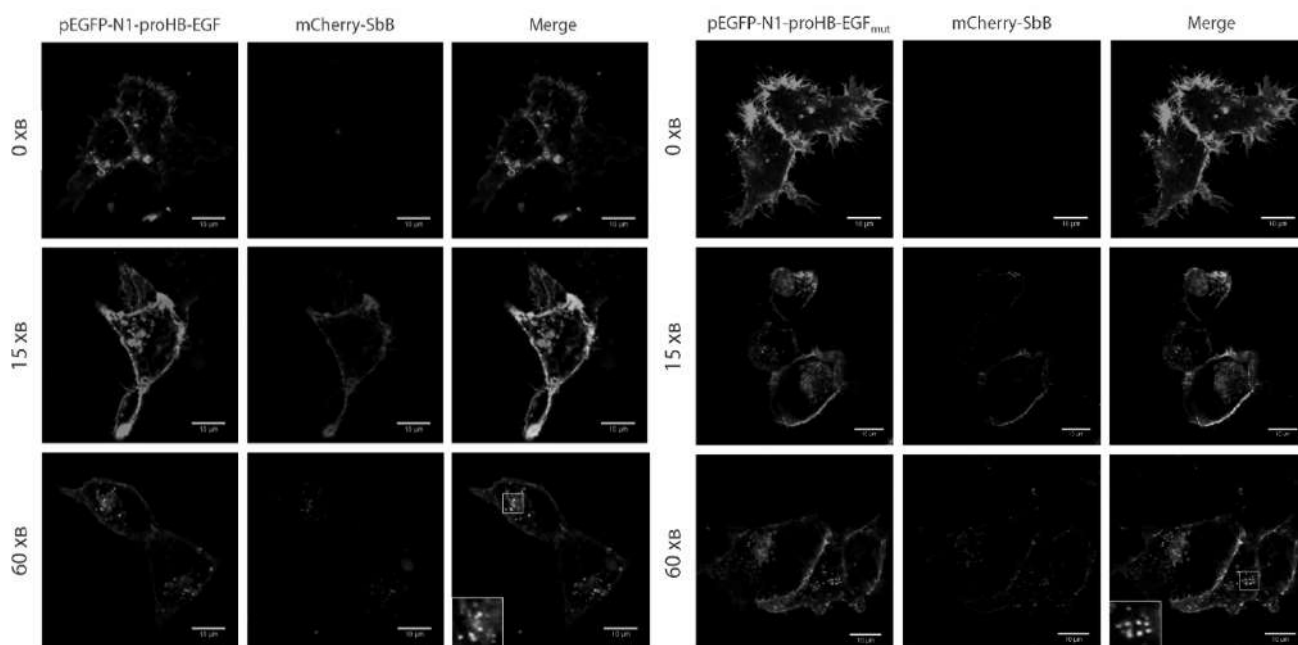


Рис. 9. Конфокальна мікроскопія препаратів клітин сублінії MDA-MB-231<sup>HB-EGF(-)</sup>, трансфікованих генетичною конструкцією *pEGFP-N1-proHB-EGF* та *pEGFP-N1-proHB-EGF<sub>(mut)</sub>* та забарвлених mCherry-SbB. proHB-EGF-EGFP – зелений канал; mCherry-SbB – червоний канал; Merge – накладання флуоресценції по зеленому та червоному каналах. Шкала на знімках відповідає 10 мкм.

Таблиця 1.

Значення  $K_D$  різних форм proHB-EGF відносно похідного ДТ - SbB визначені в клітинній системі.

	$R_{max}$		$K_d$ , нМ	
	Значення	SEM	Значення	SEM
EGFP-proHB-EGF	1874,68	179,40	303,65	43,61
EGFP-proHB-EGF <sub>(mut)</sub>	2055,41	439,65	159,64	80,20

### 3. Оцінка sHB-EGF як мішені протипухлинної терапії на моделі агресивної ракової клітинної лінії.

Для дослідження ефектів повного блокування біологічної дії sHB-EGF на функціонування клітин лінії A431 зручним підходом є використання поліклональних антитіл. Для їх отримання було проведено імунізацію лабораторних тварин (кролів та мишей). В якості антигену використовувався рекомбінантний sHB-EGF. В результаті були отримані високоспецифічні антитіла, проте оскільки сироватка кролів характеризувалась більш високим титром, саме кролячі антитіла було обрано для проведення подальших досліджень.

Для дослідження здатності отриманих поліклональних антитіл до sHB-EGF людини перешкоджати процесу формування рецептор-лігандного комплексу, було проаналізовано зв'язування флуоресцентно-міченого похідного mCherry-sHB-EGF з клітинами лінії A431 методом протокової цитометрії. Було підтверджено, що блокування взаємодії sHB-EGF спостерігалось при розведенні імунної сироватки в середовищі 1:500, а при розведенні 1: 100 значення інтенсивності флуоресценції були практично однаковими з контрольним значенням (таблиця 2). Таким чином, отримані поліклональні антитіла є нейтралізуючими та ефективно блокують взаємодію sHB-EGF з рецепторами фактору росту.

Таблиця 2.

Значення геометричного середнього інтенсивності флуоресценції клітин лінії A431 оброблених mCherry-sHB-EGF та комбінацією імунних сироваток.

Зразок	Значення GeoMean
автофлуоресценція	125,462
mCherry	119,406
mCherry-sHB-EGF	448,158
mCherry-sHB-EGF + імунна сироватка (1:100)	284,548
mCherry-sHB-EGF + імунна сироватка (1:500)	361,949
mCherry-sHB-EGF + неімунна сироватка (1:100)	412,838

Дослідження впливу поліклональних антитіл на проліферацію клітин A431 проводили за допомогою МТТ-тесту. Було виявлено переконливий цитотоксичний та антимитогенний ефект отриманої сироватки крові кроля, що містить анти-sHB-EGF поліклональні антитіла (рис. 10А). За результатами аналізу МТТ, додавання саме імунної сироватки сповільнювало метаболічну та проліферативну активність клітин A431 і згодом зменшувало їх виживання. Також могла мати місце цитостатична активність анти-sHB-EGF поліклональних антитіл, спровокована блокуванням sHB-EGF, який злуцується з плазматичної

мембрани A431 або штучно додавалась у культуральне середовище під час дослідження.

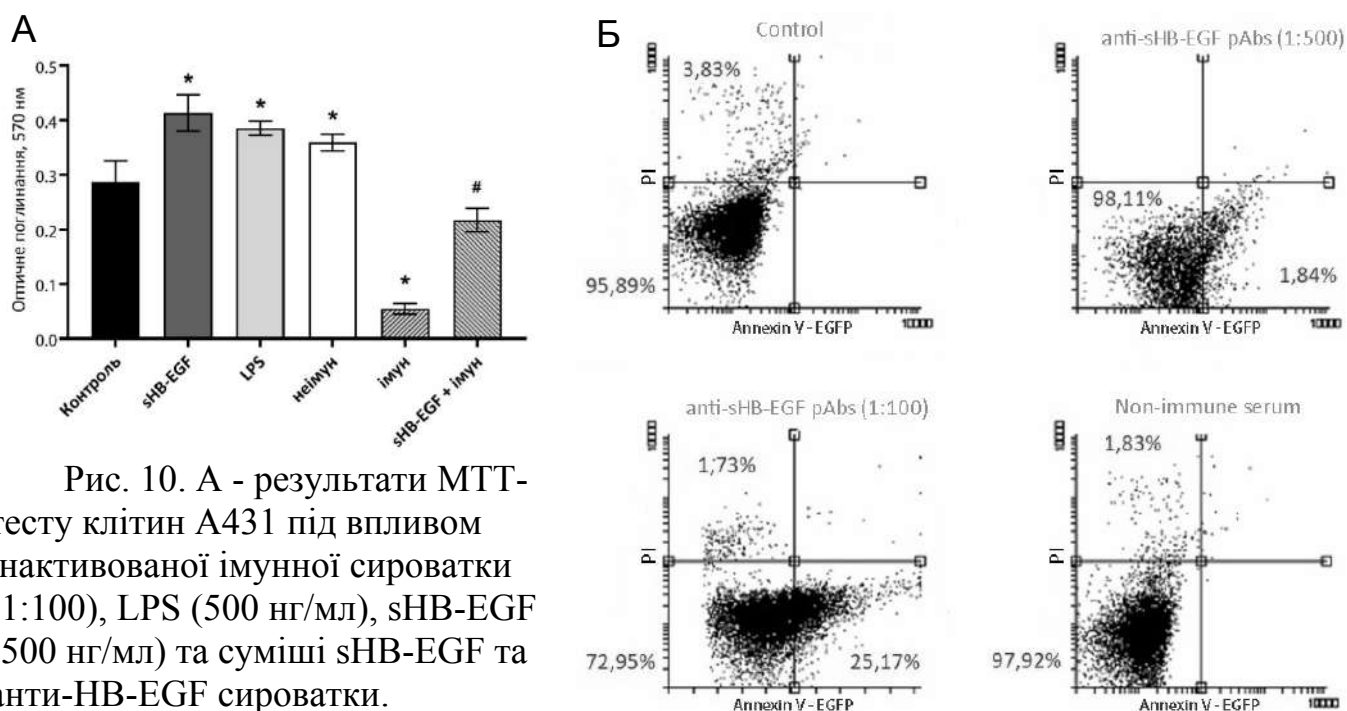


Рис. 10. А - результати МТТ-тесту клітин А431 під впливом інактивованої імунної сироватки (1:100), LPS (500 нг/мл), sHB-EGF (500 нг/мл) та суміші sHB-EGF та анти-НВ-EGF сироватки.

Приведені значення  $M \pm SD$ ,  $n =$

18; \*  $P < 0,05$  відносно до контролю, #  $P < 0,05$  відносно до sHB-EGF. Б - аналіз цитотоксичного впливу поліклональних антитіл до sHB-EGF людини на клітини лінії А431 з використанням анексіну V-EGFP та PI методом протокової цитометрії.

Отже, блокування активності sHB-EGF специфічними антитілами призводить до помітного пригнічення виживання клітин. Ми визначали механізм загибелі клітин, виявлений в аналізі на проліферацію, використовуючи тест з Анексин V - EGFP - пропідій йодидом (PI). Ми показали, що через 24 години інкубації в присутності антитіл проти НВ-EGF в імунній сироватці (1:100) кількість клітин, активно забарвлених Анексіном V-EGFP, збільшується на чверть порівняно з контролем, що вказує на загибель клітин шляхом апоптозу.

Таким чином, нами було продемонстровано ефективність пригнічення НВ-EGF опосередкованої проліферації та виживання агресивної моделі ракових клітин. Отже, пошук та розробка ефективного нейтралізуючого агента проти sHB-EGF є важливим та перспективним напрямком дослідження для створення нової цільової протипухлинної терапії.

## ВИСНОВКИ

Отже, в дисертаційній роботі були отримані результати, що розкривають вплив гепарин-зв'язувального домену в структурі HB-EGF людини на швидкість утворення комплексів секреторної форми HB-EGF з EGFR і їх подальшої інтерналізації та силу і тривалість фосфорилування рецептору, а також підтверджують його значення для утворення стабільного комплексу з похідним дифтерійного токсину.

1. На моделі клітин аденокарциноми людини показано, що взаємодія рекомбінантного sHB-EGF з ГСПГ призводить до більш пізньої інтерналізації ростового фактору, проте забезпечує стабільну та тривалу активацію EGFR.

2. Було створено рекомбінантні похідні трансмембранної форми HB-EGF з різними мутаціями в гепарин-зв'язувальному домені для експресії в евкаріотичній системі.

3. З використанням системи для редагування геному CRISPR/Cas9 було одержано клітинну лінію MDA-MB-231 з відсутньою експресією функціонального HB-EGF, що було підтверджено тестом з природним лігандом трансмембранної форми ростового фактору – дифтерійним токсином.

4. Було продемонстровано внутрішньоклітинний транспорт рекомбінантного похідного дифтерійного токсину mCherry-SbV трансмембранною формою HB-EGF за відсутності асоціації з ГСПГ. Розраховано константи дисоціації для нормальної та мутованої (з відсутнім гепарин-зв'язувальним доменом) форм proHB-EGF, які свідчать про вищу афінність взаємодії мутованої форми proHB-EGF з рекомбінантним лігандом SbV.

5. Було одержано поліклональні антитіла до sHB-EGF та виявлено цитотоксичний ефект повної нейтралізації біологічної дії ростового фактору на моделі агресивної ракової клітинної лінії *in vitro*.

### За темою роботи опубліковані роботи у фахових виданнях:

1. **Krynina O.I.**, Manoilov K.Yu., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Role of the sHB-EGF heparin-binding domain in EGFR intracellular trafficking. Ukr. Biochem. J., 2019, Vol. 91, N. 4. – pp. 26-32.

Особистий внесок Криніної О.І. – експресія та очищення рекомбінантних похідних sHB-EGF людини, дослідження взаємодії похідних sHB-EGF з поверхнею клітин A431, дослідження ендоцитозу похідних sHB-EGF та обробка конфокальних знімків. Аналіз експериментальних даних, участь у написанні статті.

2. **Krynina O.I.**, Korotkevych N.V., Labyntsev A.J., Romaniuk S.I., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Influence of human HB-EGF secreted form on cells with different EGFR and ErbB4 quantity. Ukr. Biochem. J., 2019, Vol. 91, N. 5. – pp. 27-35.

Особистий внесок Криніної О.І. – експресія та виділення рекомбінантного похідного mCherry-sHB-EGF, визначення експресії рецепторів EGFR та ErbB4 на поверхні клітин, вестерн-блот аналіз активації сигнальних кіназ. Аналіз експериментальних даних, участь у написанні статті.

3. Siromolot A.A., **Krynina O.I.**, Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Anti-human HB-EGF neutralizing polyclonal antibodies inhibit malignant cells proliferation. *Experimental Oncology*, 2020, Vol. 42, N. 1. – pp. 25-30.

Особистий внесок Криніної О.І. – експресія та очищення рекомбінантних похідних sHB-EGF людини та миші, участь у перевірці нейтралізаційної активності отриманих поліклональних антитіл, проведення проліферативного тесту та тесту з анексин V – пропідій йодидом. Аналіз експериментальних даних, участь у написанні статті.

4. Короткевич Н.В., Лабинцев А.Ю., Манойлов К.Ю., **Криніна О.І.**, Дяченко Л.В., Колибо Д.В., Комісаренко С.В. Клітинна модель для дослідження рецепторної та регуляторної функцій proHB-EGF людини. *Ukr. Biochem. J.*, 2014, T. 86, № 4. – С. 68 - 79.

Особистий внесок Криніної О.І. – дизайн генетичної конструкції, пошук позитивних трансформованих клонів бактерій-продуцентів, культивування клітинної лінії Vero , а також участь у написанні статті.

5. Manoilov K.Yu., **Krynina O.I.**, Labyntsev A.Yu., Romaniuk S.I., Kolybo D.V. Necessity of translocation domain for realisation of cytostatic effect of non-toxic derivatives of diphtheria toxin. *Biotechnologia Acta*, V. 11, No. 2, 2018.

Особистий внесок Криніної О.І. – участь у проведенні культивування клітин раку грудної залози людини лінії MDA-MB-231 за умов присутності протеїнів CRM197, SbB та Rd в культиваційному середовищі. Проведення фіксації та забарвлення колоній. Аналіз експериментальних даних, участь у написанні статті.

6. Manoilov K.Yu., **Krynina O.I.**, Korotkevych N.V., Labyntsev A.Yu., Kolybo D.V. Cytoprotective effects of soluble HB-EGF on A431 cells under exposure to doxorubicin and in prevention of cell death in low density cultures. *Youth and Progress of Biology: Book of abstracts of XL International Scientific Conference for students and PhD students (Lviv, 20-23 April 2015)*. –2015. –P. 42-43.

7. **Krynina O.I.**, Manoilov K.Yu., Labyntsev A.Yu. Role of the proHB-EGF heparin-binding domain in diphtheria toxin binding. (2nd Conference for Young Scientists (CYS-2017)). *Ukr. Biochem. J.* – 2017. – Vol. 89, N 3– P. 106.

8. **Krynina O.I.**, Manoilov K.Yu., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Effect of HB-EGF interaction with heparan sulfate proteoglycans on growth factor internalization to cytoplasm. (XI Parnas Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”). *Ukr. Biochem. J.* – 2018. – Vol. 90, Special Issue – P. 152.

9. Manoilov K.Yu., **Krynina O.I.**, Labyntsev A.Yu., Romanyuk S.I., Kolybo D.V. Translocation domain of diphtheria toxin (DT) participayes in the realization of antitumor effect of non-toxic recombinant DT derivatives. (XI Parnas Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”). *Ukr. Biochem. J.* – 2018. – Vol. 90, Special Issue – P. 155.

10. **Krynina O.I.**, Manoilov K.Yu., Kolybo D.V. Role of the sHB-EGF heparin-binding domain in EGFR intracellular trafficking. (15 Horizons in Molecular Biology, 10th-13th September 2018 Göttingen, Germany). p.128.

11. **Krynina O.I.**, Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Development of knockout heparin-binding EGF-like growth factor cell line by CRISPR/Cas-mediated genome editing, XII UBC, 2019. p. 105-106.

## АНОТАЦІЯ

**Криніна О.І.** Біологічна роль гепарин-зв'язувальної ділянки в структурі гепарин-зв'язувального EGF-подібного фактору росту. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія». – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню ролі гепарин-зв'язувального домену у структурі НВ-EGF людини та його значення для забезпечення біологічної активності ростового фактору, а саме рецепції дифтерійного токсину та утворення комплексів секреторної форми з EGFR і їх подальшої інтерналізації.

З використанням повнорозмірної та вкороченої (з делецією гепарин-зв'язувального домену) форм рекомбінантного sHB-EGF показано більш пізню інтерналізацію sHB-EGF, порівняно зі вкороченою формою. Методом вестерн-блот аналізу лізатів клітин A431, стимульованих повнорозмірним чи вкороченим sHB-EGF показано, що відсутність взаємодії sHB-EGF з ГСПГ викликає більш раннє фосфорилування EGFR, проте воно є менш сильним.

Було створено генетичні конструкції, що кодують флуоресцентно-мічений proHB-EGF та sHB-EGF дикого типу та з двома типами мутацій: амінокислотними замінами позитивно-заряджених амінокислот на аланін та делецією всієї ділянки. Було проведено оцінку зв'язування різними формами sHB-EGF похідного ДТ – субодиниці В (SbB) – методом імуноензимного аналізу та виявлено, що sHB-EGF з делецією гепарин-зв'язувальної ділянки мало більше значення Кд, порівняно з нормальною чи мутованою формою ростового фактору.

На основі клітин MDA-MB-231 за допомогою системи CRISPR/Cas9 було створено сублінію з відсутньою експресією НВ-EGF.

Створені генетичні конструкції, що кодують proHB-EGF з мутаціями і без них, використовувались для трансфекції клітин MDA-MB-231<sup>HB-EGF(-)</sup>. Вперше було продемонстровано внутрішньоклітинний транспорт рекомбінантного похідного ДТ спільно з proHB-EGF з мутованим гепарин-зв'язувальним доменом. Також було виявлено, що асоціація proHB-EGF з ГСПГ на поверхні клітини зменшувала стабільність комплексу з похідним ДТ, ймовірно, через конформаційні перебудови всередині самої молекули ростового фактору.

В рамках цієї дисертаційної роботи також було отримано НВ-EGF-нейтралізуючі поліклональні антитіла та протестовано їх антипроліферативний ефект на клітини лінії A431.

**Ключові слова:** НВ-EGF, гепаран сульфат протеоглікани, EGFR, дифтерійний токсин, константа дисоціації, ендоцитоз, CRISPR/Cas9, поліклональні антитіла.



## SUMMARY

**Krynina O.I. Biological role of heparin-binding site in the structure of heparin-binding EGF-like growth factor.** - Qualification scientific work on the rights of manuscripts.

Thesis for a candidate degree in biological sciences (Doctor of Philosophy) in specialty 03.00.04 "Biochemistry". - Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, 2020.

The purpose of this thesis was to investigate the role of the heparin-binding domain in the structure of human HB-EGF and its importance for the biological activity of growth factor, namely the binding of diphtheria toxin and the formation of sHB-EGF complexes with EGFR and their subsequent internalization.

Using full-length and truncated (with deletion of the heparin-binding domain) forms of recombinant sHB-EGF, it has been shown later internalization of sHB-EGF, compared to the truncated form. Western blot analysis of lysates of A431 cell stimulated with full-length or truncated sHB-EGF showed that the lack of interaction of sHB-EGF with HSPGs causes earlier phosphorylation of EGFR, but it is less potent.

To investigate the role of the heparin-binding domain in the reception of diphtheria toxin (DT), we created genetic constructs encoding fluorescently labelled proHB-EGF and wild-type sHB-EGF with two types of mutations: amino acid substitutions of positively charged amino acids to alanine and the whole domain deletion. sHB-EGF various forms binding of derivative DT - subunit B (SbB) - was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay. It was found that sHB-EGF with deletion of the heparin-binding site had a higher K<sub>d</sub> value compared to the normal or mutated form of growth factor.

Using MDA-MB-231 cells and the CRISPR/Cas9 modified subline with the lack of HB-EGF expression was created. Genetic constructs encoding proHB-EGF with and without mutations were used for MDA-MB-231<sup>HB-EGF(-)</sup> cell transfection. Intracellular transport of a recombinant DT derivative mediated by proHB-EGF with a mutated heparin-binding domain was demonstrated for the first time. It was also found that the association of proHB-EGF with HSPGs on the cell surface reduced the stability of the complex with the DT derivative, probably due to conformational rearrangements within the growth factor molecule itself.

Within this dissertation, HB-EGF-neutralizing polyclonal antibodies were also obtained and their antiproliferative effect on A431 cells was revealed.

**Key words:** HB-EGF, heparan sulfate proteoglycans, EGFR, diphtheria toxin, dissociation constant, endocytosis, CRISPR/Cas9, polyclonal antibodies.