

УДК 577.2

МОДУЛЬНЫЕ НАНОТРАНСПОРТЕРЫ, СПОСОБНЫЕ ВЫЗЫВАТЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ ДЕГРАДАЦИЮ N-БЕЛКА ВИРУСА SARS-COV-2 В КЛЕТКАХ A549 С ВРЕМЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ЭТОГО БЕЛКА, СЛИТОГО С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ БЕЛКОМ *MRUBY3*

© 2024 г. Ю. В. Храмцов¹, А. В. Уласов¹, Т. Н. Лупанова¹,
академик РАН Г. П. Георгиев¹, член-корреспондент РАН А. С. Соболев^{1,2,*}

Поступило 30.11.2023 г.

После доработки 15.12.2023 г.

Принято к публикации 18.12.2023 г.

Созданы модульные нанотранспортеры (МНТ), содержащие антителоподобную молекулу, монободи, к N-белку вируса SARS-CoV-2, а также аминокислотную последовательность, привлекающую E3-лигазу Kear1 (E3BP). В данный МНТ также был введен сайт отщепления E3BP-монободи от МНТ в кислых эндоситозных компартментах. Показано, что данное отщепление эндосомной протеазой катепсином В приводит к увеличению сродства E3BP-монободи к N-белку в 2.7 раза. На клетках A549 с временной экспрессией N-белка, слитого с флуоресцентным белком *mRuby3*, было показано, что инкубация с МНТ приводит к достоверному уменьшению флуоресценции *mRuby3*. Предполагается, что разработанные МНТ могут служить основой для создания новых противовирусных препаратов против вируса SARS-CoV-2.

Ключевые слова: нуклеокапсидный белок, SARS-CoV-2, проточная цитофлуориметрия, термофорез, катепсин В, E3-лигаза, Kear1.

DOI: 10.31857/S2686738924020085, EDN: WFGUMP

ВВЕДЕНИЕ

Необходимость в разработке новых противовирусных препаратов особенно ярко продемонстрировала пандемия коронавируса SARS-CoV-2. Наиболее часто используются низкомолекулярные ингибиторы вирусной активности [1]. Однако их можно подобрать не ко всем белковым мишеням, в отличие от антителоподобных молекул, которые можно получить к практически любому белковому антигену [2, 3]. Не удивительно, что в различных системах доставки биоактивных молекул все чаще используются разные антителоподобные молекулы [4]. Для вируса SARS-CoV-2 в качестве белка-мишени можно выбрать крайне необходимый для сборки вирусного капсида нуклеокапсидный белок, или N-белок [5–7]. К этому белку высокое сродство имеет полученная ранее антителоподобная молекула, монободи (NC2) [8]. Ранее мы раз-

работали модульные нанотранспортеры (МНТ), содержащие в своем составе данное монободи и способные связываться в клетках-мишенях с N-белком [9], в настоящей работе обозначаемые как МНТ₀. Следующий вариант МНТ, МНТ₁, отличался от МНТ₀ тем, что в него была дополнительно включена аминокислотная последовательность DPETGEYL (далее – E3BP), способная с высоким сродством связывать убиквитинлигазу Kear1 [10]. Мы предположили, что связывание МНТ₁ одновременно с Kear1 и N-белком будет приводить к деградации N-белка как следствие его убиквитинирования [11]. В состав МНТ₁, так же как и у МНТ₀, был внесен сайт для отщепления E3BP-монободи от МНТ₁ в закисляемых эндоситозных компартментах. Настоящая работа посвящена как изучению взаимодействия МНТ₁ и расщепленного МНТ₁ с N-белком в растворе, так и влиянию МНТ₁ на содержание N-белка в клетках A549, временно экспрессирующих этот белок.

Наработку и очистку N-белка и МНТ₀ проводили, как это описано в [9]. Сайт-специфическим мутагенезом из МНТ, описанного ранее [9], получили ген, кодирующий МНТ следующего состава: affibody(EGFR)-HisTag-DTox-HMP-FKFL-E3BP-

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Москва

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

*E-mail: alsobolev@yandex.ru

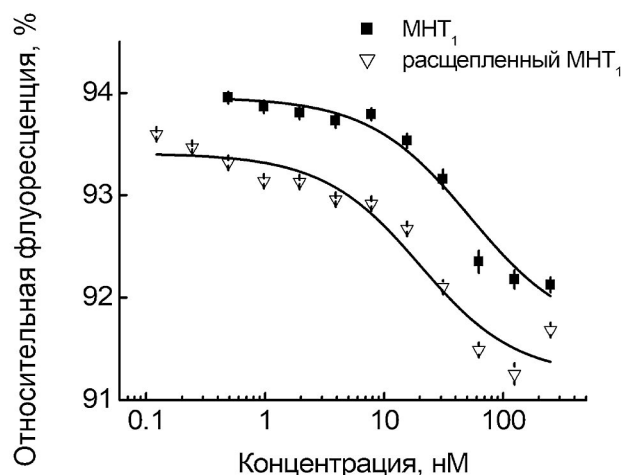


Рис. 1. Зависимости относительной интенсивности флуоресценции (за 100% принята интенсивность флуоресценции до начала термофореза) через 20 с после начала термофореза от концентрации МНТ₁ или расщепленного МНТ₁ при постоянной концентрации N-белка, меченного AF488 (5 нМ). Указана стандартная ошибка определения относительной интенсивности флуоресценции (14–17 повторов).

NC2, где affibody(EGFR) — аффибоди к рецептору эпидермального фактора роста, DTox — транслокационный домен дифтерийного токсина, НМР — гемоглобиноподобный белок *E. coli*, FKFL — сайт расщепления эндосомной протеазой катепсином В, ЕЗВР — аминокислотная последовательность, привлекающая Е3-лигазу Keap1 и NC2 — монободии к N-белку. Экспрессию МНТ₁ проводили в штамме *E. coli* Ros(DE3)pLysS. Автоиндукцию экспрессии МНТ₁ проводили инкубацией в течение 48 ч при 18 °С. МНТ₁ выделяли из растворимой фракции [12], а затем очищали аффинной хроматографией на носителе HisTrap FF (Cytiva). Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле продемонстрировал достаточную степень чистоты полученного МНТ₁ (86.6%).

Для получения расщепленного МНТ₁ инкубировали 4 мкМ МНТ₁ с 4 мкг/мл активированного катепсина В (Native human Cathepsin B protein (ab90387, Abcam)). Активацию катепсина В проводили, как описано в [14]. Расщепление МНТ₁ проводилось при pH 5.5 с добавлением 0.001% SDS, чтобы избежать агрегации МНТ₁. Взаимодействие МНТ₁ и расщепленного МНТ₁ с N-белком изучали так же, как описано в [13], методом термофореза на приборе Monolith NT.115 Series (NanoTemper Technologies GmbH, Германия) в буфере 10 мМ NaH₂PO₄, 150 мМ NaCl, pH 8.0. N-белок был помечен флуоресцентным красителем AF488, как это описано в [13] и с той же степенью модификации. Трансфекция клеток A549 плазмидой (3–4% трансфицированных клеток), кодирующей N-белок,

слитый с флуоресцентным белком *mRuby3*, осуществлялась по [13].

При фиксированной концентрации N-белка, меченного AF488, (5 нМ) методом термофореза были получены зависимости относительной флуоресценции (за 100% принята флуоресценция до начала термофореза) через 20 с после начала термофореза от концентрации МНТ₁ (рис. 1, квадраты) или расщепленного МНТ₁ (см. рис. 1, полые треугольники). Для каждого эксперимента получали три-четыре такие зависимости, и весь эксперимент повторяли три-четыре раза. По каждой кривой определяли константу диссоциации комплекса МНТ₁ или расщепленного МНТ₁ с N-белком, ее усредняли по всем 12–17 кривым и определяли относительную ошибку ее измерения. Константы диссоциации комплексов МНТ₁ или расщепленного МНТ₁ с N-белком составили 47 ± 3 и 17 ± 4 нМ соответственно. Для расщепленного МНТ₁ это значение близко к константе для свободного монободии NC2 (6.7 нМ [8]). Таким образом, расщепление МНТ₁ катепсином В приводит к увеличению его сродства к N-белку приблизительно в три раза.

За процессом деградации слитого белка N-*mRuby3* в клетках A549 с временной экспрессией данного белка наблюдали с использованием проточной цитофлуориметрии на приборе MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, Франция) в канале флуоресценции 571–601 нм, флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 561 нм. Клетки с временной экспрессией белка N-*mRuby3* инкубировали с 500 нМ МНТ₁ или МНТ₀ в течение заданного времени, отмывали, снимали с подложки и изучали в канале флуоресценции *mRuby3* на проточном цитофлуориметре. На рис. 2 показана зависимость флуоресценции клеток A549 от времени инкубации с МНТ₁ или МНТ₀. На 5 часов средняя флуоресценция клеток A549 достоверно ($p < 0.05$, U-критерий Манна Уитни) ниже в случае, когда клетки инкубировали с МНТ₁, по сравнению с инкубацией с МНТ₀. Уменьшение флуоресценции *mRuby3* можно связать с деградацией слитого белка N-*mRuby3*. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что включение в разработанные нами МНТ аминокислотной последовательности, привлекающей Е3-лигазу Keap1, может приводить к деградации N-белка в клетках-мишенях.

Как мы показали ранее, отщепление монободии от МНТ₀ приводит к существенному уменьшению константы диссоциации комплекса N-белка с этим монободии (с 116 ± 20 до 10 ± 3 нМ) [9]. В настоящей работе заметное увеличение сродства наблюдается и для МНТ₁ (константа диссоциации уменьшается с 47 ± 3 до 17 ± 4 нМ). Иными словами, отщепленный

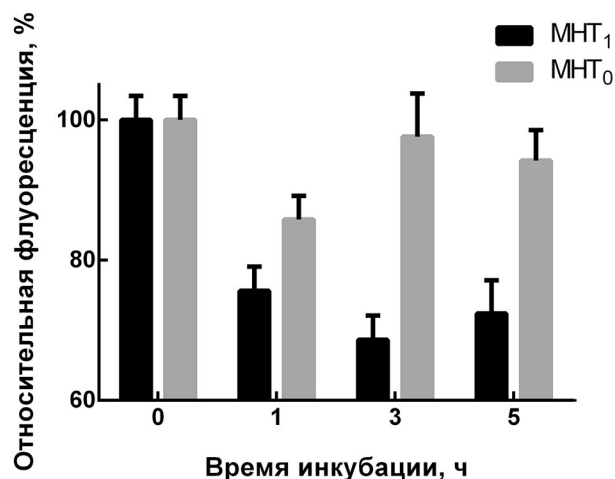


Рис. 2. Относительная флуоресценция клеток A549 (флуоресценция клеток, к которым не добавлялся МНТ была принята за 100%) при их инкубации различных времен с 500 нМ МНТ₁ или 500 нМ МНТ₀. Указаны средние значения с соответствующей среднеквадратичной ошибкой ($n = 3-9$).

фрагмент в клетке-мишени будет взаимодействовать с N-белком заметно лучше, чем полноразмерный МНТ. Известно, что конкурентное взаимодействие с N-белком потенциально способно нарушить весь процесс сборки новых вирусных частиц [15], а значит, подавить распространение вируса в организме. В настоящей работе на это воздействие на N-белок накладывается еще его вероятная деградация за счет привлечения к нему ЕЗ-лигазы, что, по нашему мнению, должно кардинально сказаться на сборке вирусного капсида.

Мы предполагаем, что разработанные МНТ могут послужить основой для создания новых противовирусных препаратов против вируса SARS-CoV-2. Причем примененный в данной работе подход в перспективе может оказаться эффективным против не только этого вируса, но и других вирусов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-14-00130). Эксперименты были выполнены с использованием

оборудования Центра коллективного пользования ИБГ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clercq E.D., Li G. // Clin Microbiol Rev. 2016. V. 29. P. 695–747.
2. Gebauer M., Skerra A. // Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2020. V. 60. P. 391–415.
3. Shipunova V.O., Deyev S.M. // Acta Naturae. 2022. V. 14. № 1(52). P. 54–72.
4. Tolmachev V.M., Chernov V.I., Deyev S.M. // Russ Chem Rev. 2022. V. 91. № 3. RCR5034
5. Surjit M., Lal S.K. // Infect Genet Evol. 2008. V. 8. P. 397–405.
6. Wu C., Zheng M. // Preprints. 2020. 2020020247.
7. Prajapat M., Sarma P., Shekhar N., et al. // Indian J Pharmacol. 2020. V. 52. P. 56.
8. Du Y., Zhang T., Meng X., et al. // Preprints. 2020. DOI: 10.21203/rs.3.rs-25828/v1.
9. Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Lupanova T.N., et al. // Dokl Biochem Biophys. 2023. V. 510. P. 87–90.
10. Lu M., Liu T., Jiao Q. et al. // Eur J Med Chem. 2018. V. 146. P. 251–259.
11. Fulcher L.J., Hutchinson L.D., Macartney T.J., et al. // Open biology. 2017. V. 7. 170066.
12. Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Khramtsov Y.V., et al. // Drug Des Devel Ther. 2017. V. 11. P. 1315–1334.
13. Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Lupanova T.N., et al. // Dokl Biochem Biophys. 2022. V. 506.
14. Kern H.B., Srinivasan S., Convertine A.J., et al. // Mol Pharmaceutics. 2017. V. 14(5). P. 1450–1459.
15. Wang S., Dai T., Qin Z., et al. // Nat. Cell Biol. 2021. V. 23. P. 718–732.

MODULAR NANOTRANSPORTERS CAPABLE OF CAUSE INTRACELLULAR DEGRADATION OF THE N-PROTEIN OF THE SARS-COV-2 VIRUS IN A549 CELLS WITH TEMPORARY EXPRESSION OF THIS PROTEIN FUSED WITH THE FLUORESCENT PROTEIN *MRUBY3*

Y. V. Khramtsov^a, A. V. Ulasov^a, T. N. Lupanova^a, Academician of the RAS G. P. Georgiev^a,
Corresponding Member of the RAS A. S. Sobolev^{a, b, #}

^a *Institute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russian Federation*

^b *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

[#] *E-mail: alsobolev@yandex.ru*

Modular nanotransporters (MNTs) have been created containing an antibody-like molecule, monobody, to the N-protein of the SARS-CoV-2 virus, as well as an amino acid sequence that attracts the E3 ligase Keap1 (E3BP). This MNT also included a site for cleavage of the E3BP monobody from the MNT in acidic endocytic compartments. It was shown that this cleavage by the endosomal protease cathepsin B leads to a 2.7-fold increase in the affinity of the E3BP monobody for the N-protein. Using A549 cells with transient expression of the N-protein fused with the fluorescent protein mRuby3, it was shown that incubation with MNT leads to a significant decrease in *mRuby3* fluorescence. It is assumed that the developed MNTs can serve as the basis for the creation of new antiviral drugs against the SARS-CoV-2 virus.

Keywords: nucleocapsid protein, SARS-CoV-2, flow cytometry, thermophoresis, cathepsin B, E3 ligase, Keap1.