ДОПОВІДІ
НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

10 • 2015

БІОХІМІЯ

УДК 577.217.5:577.152.611

А. Е. Малина, Є. В. Нестеренко, А. І. Драган,
член-кореспондент НАН України **О. І. Корнелюк**

Взаємодія протипухлинного цитокіну EMAP II з гамма-циклодекстрином

Досліджено взаємодію протипухлинного цитокіну EMAP II з гамма-циклодекстрином (γ-ЦД). Проведено аналіз експонованості ароматичних амінокислотних залишків у структурі рекомбінантного цитокіну EMAP II. Встановлено, що γ-ЦД специфічно зв'язується з EMAP II, і найбільш вірогідним сайтом зв'язування є частково експонований залишок Trp128, локалізований в заглибині на поверхні EMAP II поряд з функціонально важливим лізинбагатим кластером.

Ключові слова: EMAP II, гамма-циклодекстрин, флуоресценція, комплексоутворення.

Успіхи в галузі біотехнології дозволили розпочати великомасштабне виробництво терапевтично важливих пептидів і білків, які можна використовувати в лікуванні онкологічних захворювань.

Неправильний фолдинг і агрегація білків супроводжуються утворенням нерозчинних внутрішньоклітинних структур, що призводять до пошкодження і загибелі клітин. Індукувати агрегацію білків у клітинах можуть різні процеси, і насамперед це тепловий та окиснювальний стреси. In vitro нативні білки можуть бути розгорнуті в результаті теплової денатурації, а також під дією денатуруючих агентів, таких як гуанідин гідрохлорид або сечовина. Розгорнуті білки можуть взаємодіяти між собою, в основному за допомогою контактів гідрофобних поверхонь, з утворенням амілоїдних або аморфних агрегатів [1–3]. У зв'язку з цим дослідження механізму агрегації білків і механізмів пригнічення агрегації агентами природного і штучного походження є одним із актуальних напрямів сучасної біології. Циклодекстрини (олігоцукри) здатні підвищувати стабільність до агрегації білкового компонента препаратів.

EMAP II — ендотеліальний моноцитактивуючий поліпептид II, попередником якого є білок AIMP1/p43 — компонент високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК-синтетаз вищих еукаріот. Відомо, що цей пептид здатен модулювати низку властивостей ендотеліальних клітин, моноцитів і лейкоцитів *in vitro* [4, 5]. Також досліджено гальмування росту

© А. Е. Малина, Є. В. Нестеренко, А. І. Драган, О. І. Корнелюк, 2015

ксенографтів раку простати людини, імплантованих під капсулу нирки мишей при обробці їх препаратом EMAP II [6, 7]. Здатність EMAP II інгібувати неоангіогенез та стимулювати апоптоз ракових клітин є основою для дослідження питання про те, чи може цей білок бути використаний як протипухлинний лікарський препарат.

Ми ставили за мету дослідження взаємодії протипухлинного цитокіну EMAP II з γ-циклодекстрином з можливістю подальшого використання отриманих комплексів для створення лікарської форми препарату.

Матеріали і методи. Для експресії рекомбінантного білка EMAP II було використано штам-продуцент, ориманий на основі реципієнта *Escherichia coli BL21(DE3)pLysE*. Штам клітин трансформовано плазмідним вектором pET-30a-EMAP II, у якого під контролем промотору фага T7 міститься ген цільового білка EMAP II.

Експресію рекомбінантного білка EMAP II проводили на поживному середовищі LB з додаванням канаміцину до кінцевої концентрації 30 мкг/мл. Індукцію експресії EMAP II з промотору *lacUV5* здійснювали шляхом додавання до культурального середовища ізопропіл-β-тіогалактопіранозиду (ІПТГ) до кінцевої концентрації 1,25 мМ [8]. Концентрацію очищеного білка визначали на спектрофотометрі з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції, який становить 8730 $см^{-1} \cdot М^{-1}$ (коефіцієнт визначали за даними амінокислотного складу білка з використанням програми ProtParam (http://web. expasy. org/protparam/)).

Розчин трипептиду гліцин-триптофан-гліцин ("Serva") готували в аналогічному буфері, в якому був розчинений білок: 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl з pH 7,5. Концентрацію трипептиду визначали на спектрофотометрі з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції, який становить 5690 $см^{-1} \cdot М^{-1}$.

Гамма-циклодекстрин (γ-ЦД) має вісім глюкопіранозних залишків, молекулярну масу 1297,14 Да, зовнішній та внутрішній діаметр 16,9 і 8,4 Å відповідно. Також γ-ЦД характеризується високим ступенем розчинності у воді при кімнатній температурі (23,2 г/100 мл). Для дослідження взаємодії рекомбінантного білка EMAP II та γ-ЦД проводили титрування в буфері, який містив 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl з pH 7,5.

Методика флуоресцентних вимірювань. Спектри флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі Hitachi M850 (Японія), який був обладнаний термостатованим кюветотримачем. Вимірювання проводили у кварцовій кюветі з довжиною оптичного шляху 0,5 см. Спектральна ширина щілин для монохроматорів збуджуючого світла і реєструючої системи становила 5–10 нм. Довжина хвилі збудження дорівнювала 280 нм, інтервал довжин хвиль для спектрів флуоресценції становив 300–400 нм, реєстрацію флуоресценції проводили під кутом 90° до напрямку пучка збуджуючого світла при $25 \pm 0{,}2$ °C.

Молекулярний докінг виконували за допомогою онлайн сервісу HexServer (hexserver.loria.fr/). Результати візуалізували за допомогою програми PyMol. Аналіз експонованості амінокислотних залишків здійснювали за допомогою онлайн сервісу GetArea (http://curie.utmb.edu/getarea.html). Координатний файл EMAP II (id: 1E7Z) було завантажено з інтернет-ресурсу www.rcsb.org.

Результати та їх обговорення. З літературних джерел відомо, що всі циклодекстрини в першу чергу зв'язуються з ароматичними амінокислотними залишками, тому було проведено модельне дослідження взаємодії трипептиду гліцин-триптофан-гліцин з γ-ЦД. Як видно з рис. 1, під час титрування трипептиду розчином γ-ЦД інтенсивність флуоресценції трипептиду зростає, що може свідчити про міцне зв'язування ліганду з гліцин-триптофан-гліцином. Про це також свідчить константа зв'язування, яка становить $22{,}59 \pm 6{,}17$ мМ. Стехіометрія зв'язування ліганду 1 : 1.

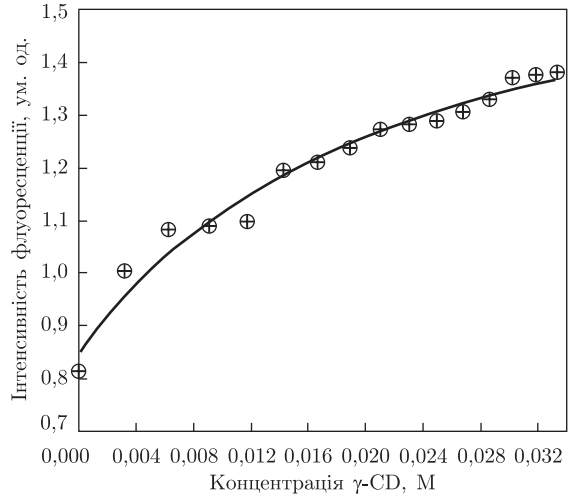

Рис. 1. Залежність інтенсивності флуоресценції трипептиду гліцин-триптофан-гліцин від конценрації γ-ЦД у розчині. Буфер 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl з pH 7,5, температура 25 °C, довжина хвилі збудження 280 нм, довжина хвилі емісії 355 нм

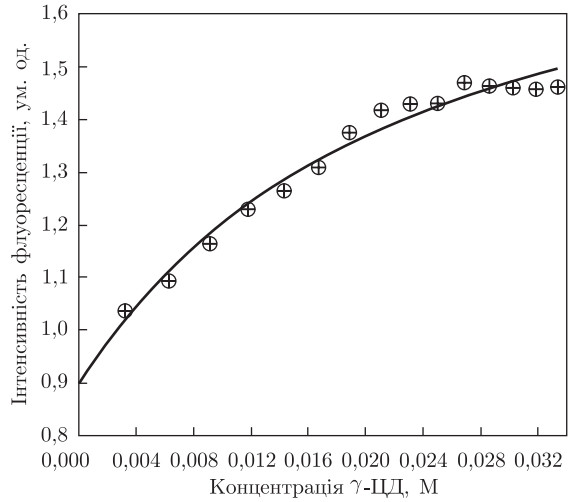

Рис. 2. Залежність інтенсивності флуоресценції протипухлиного цитокіну EMAP II від конценрації γ-ЦД у розчині. Буфер 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl з pH 7,5, температура 25 °C, довжина хвилі збудження 280 нм, довжина хвилі емісії 334 нм

Під час взаємодії протипухлинного цитокіну EMAP II з γ-ЦД інтенсивність флуоресценції EMAP II зростає в 1,6 раза (рис. 2), що вказує на міцне зв'язування, а константа зв'язування ліганду з EMAP II становить $23{,}02 \pm 4{,}52$ мМ.

Проведено аналіз експонованості ароматичних амінокислотних залишків у структурі рекомбінантного цитокіну EMAP II. Відомо, що EMAP II має у своєму складі шість ароматичних амінокислот: Tyr32, Phe110, Phe113, Trp128, Tyr145 і Phe150. Найбільш експонованим на 18,6% є залишок Trp128, який знаходиться в заглибині активного центру протеїну.

Для дослідження взаємодії γ-ЦД з ароматичними амінокислотами було проведено молекулярний докінг трипептиду гліцин-триптофан-гліцин з γ-ЦД за допомогою онлайн сервісу

HexServer. Встановлено, що взаємодія трипептиду з γ-ЦД відбувається між триптофановим залишком та внутрішньою гідрофобною порожниною ліганду. За результатами молекулярного докінгу визначено, як саме відбувається взаємодія ароматичної амінокислоти в складі трипептиду з γ-ЦД.

Таким чином, встановлено, що γ-ЦД специфічно зв'язується з EMAP II, причому найбільш вірогідним сайтом зв'язування є частково експонований залишок Trp128, локалізований у заглибині на поверхні EMAP II поряд з функціонально важливим лізинбагатим кластером.

Цитована література

1. *Абелян В. А.* Циклодекстрины: получение и применение. – Ереван: ИД "Ван – Арьян", 2001. – 519 с.
2. *Saenger W.* Cyclodextrin Inclusion Compounds in Research and Industry // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 1980. – **19**. – P. 344–362.
3. *Fink A. L.* Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid // Fold. Des. – 1998. – **3**. – P. R9-R23.
4. *Kao J., Rayan J., Brett G., Chen J., Shen H., Fan Y., Godman G., Familetti P. C., Wang F., Pan Y. E., Stern D., Clauss M.* Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms // J. Biol. Chem. – 1992. – **267**. – P. 20239–20247.
5. *Tas M. P., Murray J. C.* Endothelial monocyte-activating polypeptide II // Int. J. Biochem. Cell. Biol. – 1996. – **28**. – P. 837–841.
6. *Reznikov A. G., Chaykovskaya L. V., Polyakova L. I., Kornelyuk A. I.* Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcionoma in mouse xenograft model // Exp. Oncol. – 2007. – **29**, No 4. – P. 267–271.
7. *Возианов А. Ф., Резников А. Г., Корнелюк А. И., Романенко А. М., Чайковская Л. В., Полякова Л. И., Григоренко В. Н.* Влияние препаратов рекомбинантного белка EMAP II на рост, гистологические и гистохимические характеристики гетеротрансплантатов рака простаты человека // Журн. АМН України. – 2008. – **14**, № 4. – С. 719–729.
8. *Бабенко Л. А., Скоробогатов О. Ю., Дубровський О. Л., Корнелюк О І.* Оптимізація бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна EMAP II в клітинах *Esherichia coli BL21(DE3)pLysE* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2010. – № 3. – С. 21–31.

References

1. *Abelyan V. A.* Cyclodextrins: preparation and use, Erevan: "Van–Aryan", 2001 (in Russian).
2. *Saenger W.* Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1980, **19**: 344 — 362.
3. *Fink A. L.* Fold. Des., 1998, **3**: R9–R23.
4. *Kao J., Rayan J., Brett G., Chen J., Shen H., Fan Y., Godman G., Familetti P. C., Wang F., Pan Y. E., Stern D., Clauss M.* J. Biol. Chem., 1992, **267**: 20239–20247.
5. *Tas M. P., Murray J. C.* Int. J. Biochem. Cell. Biol., 1996, **28**: 837–841.
6. *Reznikov A. G., Chaykovskaya L. V., Polyakova L. I., Kornelyuk A. I.* Exp. Oncol., 2007, **29**, No 4: 267–271.
7. *Vozianov A., Reznikov A. Kornelyuk A., Romanenko A., Kornelyuk A., Polyakova L., Grigorenko V.* J. AMN Ukraine, 2008, **14**, No 4: 719–729 (in Russian).
8. *Babenko L., Skorobagatov J., Dubrovskiy O., Kornelyuk O.* Microbiology and Biotechnology, 2010, No 3: 21–31 (in Ukrainian).

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

Надійшло до редакції 16.06.2015

А. Э. Малина, Е. В. Нестеренко, А. И. Драган,
член-корреспондент НАН Украины **А. И. Корнелюк**

Взаимодействие противоопухолевого цитокина EMAP II с гамма-циклодекстрином

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

Исследовано взаимодействие противоопухолевого цитокина EMAP II с гамма-циклодекстрином (γ-ЦД). Проведен анализ экспонированности ароматических аминокислотных остатков в структуре рекомбинантного цитокина EMAP II. Установлено, что γ-ЦД специфически связывается с EMAP II, причем наиболее вероятным сайтом связывания является частично экспонированный остаток Trp128, локализованный в углублении на поверхности EMAP II наряду с функционально важным лизинбогатым кластером.

Ключевые слова: EMAP II, гамма-циклодекстрин, флуоресценция, комплексообразование.

A. E. Malyna, E. V. Nesterenko, A. I. Dragan,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **O. I. Kornelyuk**

Interaction of antitumor cytokine EMAP II with gamma-cyclodextrin

Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, Kiev

The interaction of antitumor cytokine EMAP II with gamma-cyclodextrin (γ-CD) is investigated. The exposure of aromatic amino acid residues in the structure of the recombinant cytokine EMAP II has analyzed. It is found that γ-CD binds specifically with EMAP II, the most likely binding site being partially exposed residue Trp128 localized in a recess on the surface of EMAP II along with the functionally important lysine-rich cluster.

Keywords: EMAP II, gamma-cyclodextrin, fluorescence, complex binding.