

ВПЛИВ ОЛІГОРИБОНУКЛЕОТИДІВ НА КОНФОРМАЦІЮ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ ІНТЕРФЕРОНУ

Р. О. НІКОЛАЄВ, М. М. ВІВЧАРИК, С. І. ЧЕРНИХ, З. Ю. ТКАЧУК

Інститут молекулярної біології та генетики НАНУ
 Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
 e-mail: romanfromukrain@gmail.com

Мета. Вивчити здатність олігорибонуклеотидів дріжджової РНК (ОРН) та їх комплексів з D-манітолом впливати на конформацію та термічну стабільність інтерферону (ІНФ) α -2b. **Методи.** Здатність олігорибонуклеотидних препаратів зв'язуватися з ІНФ α -2b вивчали при допомозі методу гасіння його флюоресценції. Вплив препаратів ОРН на стабільність білка вивчали аналізуючи термічну стабільність ІНФ. Для підтвердження їх впливу на конформацію ІНФ проводили вивчення спектрів кругового дихроїзму. **Результати.** Показано, що комплекси ОРН з D-манітолом внаслідок їх кращого зв'язування з білком мають значно більший вплив на конформацію та термічну стабільність інтерферону α -2b, ніж ОРН. Також ОРН і та їх комплекси з D-манітолом збільшують термічну стабілізацію інтерферону. Додавання ОРН та ОРН з D-манітолом до ІНФ призводить до зменшення вмісту α -спіральних компонентів в структурі білка та збільшення β -компонент та неструктурованих частин молекули білка. Додавання комплексу ОРН:D-манітол, на відміну від ОРН змінює архітектуру третинної структури ІНФ. **Висновки.** Отже, комплекси ОРН з D-манітолом мають значно більший вплив на конформацію та термічну стабільність інтерферону α -2b, ніж вихідний препарат ОРН. Вірогідно це можна пояснити більш специфічним зв'язуванням олігонуклеотидів в присутності манітолу з білком. Також ОРН і комплекси ОРН з D-манітолом збільшують термічну стабілізацію інтерферону на 2 та 1,8 °С, відповідно. Додавання ОРН та комплексів ОРН з D-манітолом призводить до зменшення вмісту α -спіральних компонентів в структурі білка та збільшення антипаралельних β -листів, β -поворотів та неструктурованих компонентів, причому за наявності манітолу в молекулі ОРН зміна структури ІНФ відбувається більш інтенсивно. Додавання комплексів ОРН: D-манітол до ІНФ, на відміну від ОРН змінює архітектуру третинної структури білка від 2-х шарового сендвіча до альфа-бета-комплексу.

Ключові слова: олігонуклеотиди; інтерферон; манітол; вторинна структура білка.

Вступ. Олігонуклеотиди можуть зв'язуватися з ДНК або РНК з різним ступенем специфічності. З цієї причини їх розглядають, як перспективні препарати для генно-специфічної терапії при лікуванні злоякісних, вірусних та запальних захворювань. Розроблено дві основні стратегії олігонуклеотидного опосередкованого терапевтичного втручання, а саме антисмисловий та антигенний підходи. Антисмислова стратегія спрямована на зниження регуляції експресії конкретного гена шляхом гібридизації олігонуклеотиду до специфічної ділянки на мРНК, що призводить до інгібування трансляції (Bates, 1999). Антигенна стратегія пропонує інгібувати транскрипцію гена-мішені шляхом утворення потрійної спіралі між олігонуклеотидом та специфічними послідовностями в дволанцюговій геномній ДНК. Клінічні випробування, засновані на антисмисловому підході, тепер показують, що олігонуклеотиди мають слабкі токсичні ефекти (Malmgaard, 2004).

Незважаючи на те, що антисмислові та антигенні стратегії мають певний успіх, за останні роки стало зрозуміло, що взаємодія олігонуклеотидів з компонентами живого організму виходить далеко за рамки специфічної гібридизації з цільовою нуклеїновою кислотою.

Дослідження та повторна перевірка попередніх даних свідчать про те, що деякі спостережувані біологічні ефекти антисмислових олігонуклеотидів не можуть бути зумовлені повністю гібридизацією Уотсона-Крика з цільовою мРНК. У деяких випадках досягався очікуваний біологічний ефект (наприклад, інгібування росту клітин або апоптоз), але це не супроводжувалося зниженням регуляції цільового білка і, отже, навряд чи виявиться справжнім антисмисловим ефектом (Balasubramanian, 1998). У багатьох випадках було продемонстровано, що інші неспецифічні олігонуклеотиди можуть проявляти біологічні ефекти, що дорівнюють або перевищують антисмислову послідовність.

Олігонуклеотидні противірусні препарати активно застосовуються в медицині протягом останніх десятиліть, проте молекулярний механізм їх дії залишається неясним. Як було показано в нашій попередній роботі, поєднання олігорибонуклеотидів (ОРН) з алкогольним цукром D-манітолом призводить до змін їх біологічної активності та ефективності (Ткачук, 2013).

Відомо, що препарати на основі ОРН збільшують вироблення інтерферону та стимулюють неспецифічний антивірусний захист, але молекулярний механізм їх дії залишається неясним. Тому ми вивчали здатність ОРН та його комплексу з D-манітолом впливати на конформацію α -2b інтерферону — ключового білка антивірусного механізму захисту клітин.

Матеріали і методи

Здатність олігорибонуклеотидів тотальної дріжджової РНК (ОРН) та її комплексів з D-манітолом зв'язуватися з інтерфероном (ІНФ) α -2b вивчали при допомозі методу гасіння його флуоресценції (Lakowicz, 2006). Спектри флуоресценції були записані в діапазоні 300–450 нм на спектрофлюориметрі *Jasco FP-8200* при кімнатній температурі, використовуючи 1 см кювету. Для вимірювання спектрів Інтерферон- α 2b був розчинений у 5мМ Tris-HCl буфері. Початкова концентрація ІНФ становила 1.096 μ М. Титрування проводилось шляхом додавання малої кількості ОРН або ОРН:D-манітол (розчинених у тому ж буфері). Концентрація стокових розчинів

ОРН та ОРН:D-манітол складала 100мкМ. Початковий об'єм білка у кюветі становив 2 мл. На наступному етапі визначали константу взаємодії білка з додавання ліганду, в залежності від концентрації ліганду. Для цього використовували максимуми інтенсивності кожного спектру при довжині хвилі 336нм. Константи дисоціації обраховувались в програмному забезпеченні Origin 8.0 (Kumar, 2011).

Для підтвердження впливу препаратів на основі РНК на конформацію та стабільність білка, проводили аналіз термічної стабільності білка. Спектри флуоресценції ІТФ з ОРН та ІНФ з ОРН:D-манітол вимірювали в діапазоні температур 23–80 °С, підвищуючи температуру на кожні 3 °С (Kandagal et al., 2007).

Круговий дихроїзм широко застосовується для дослідження біомолекул завдяки їх херальним властивостям. Важливим є те, що вторинна структура білка проявляє чіткий спектр КД. Для підтвердження впливу препаратів на основі ОРН на вторинну структуру білка нами було проведено аналіз даних отриманих на КД спектрометрі (*Jasco J-815 CD Spectrometer*). Від спектру ІНФ+ліганд в буфері віднімався спектр ліганду з тією ж концентрацією в буфері. Далі спектр КД в одиницях [mdeg] перераховувався в одиницях молекулярної еліптичності з урахуванням концентрації ІНФ і дожини оптичного шляху кювети 1 см. Результати аналізували у сервісі <http://bestsel.elte.hu>. Алгоритм BeStSel для вторинної структури походять від алгоритму DSSP. Він був розроблений для більш глибокого аналізу вторинних β структур білків. Алгоритм BeStSel характеризує вторинну структуру білків, використовуючи вісім компонентів: паралельні та антипаралельні бета-листи, які поділяються на три підгрупи: лівооберненні, розслаблені та правооберненні, α -спіралі поділяють на регулярні частини і кінці спіралей. BeStSel сортує 3_{10} -спіралі як «неструктуровані ділянки». На рис. 1 показано вісім основних компонентів BeStSel, що стосуються DSSP. Для порівняння представлені основні компоненти алгоритму SELCON3, які також використовуються для CONTIN та CDSSTR в CDPPro.

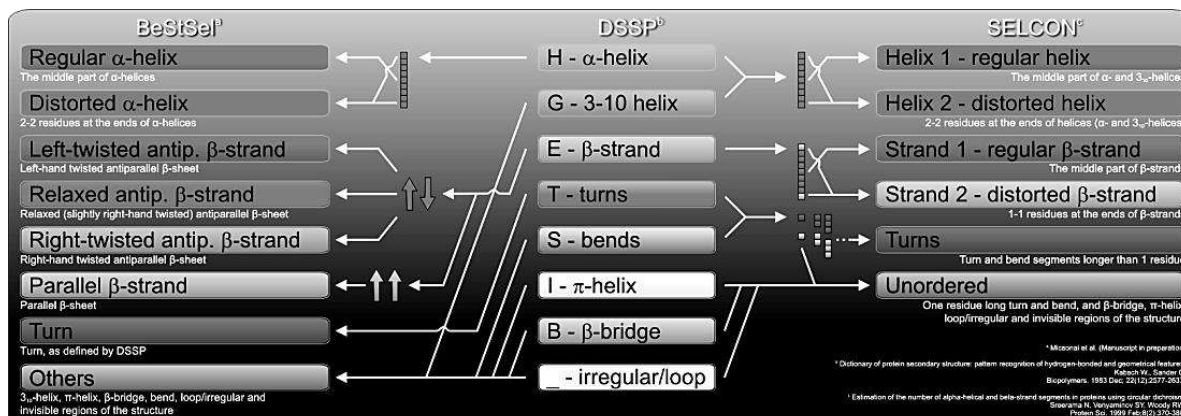


Рис.1. Відмінність алгоритму BeStSel від старіших алгоритмів для опрацювання КД спектрів.

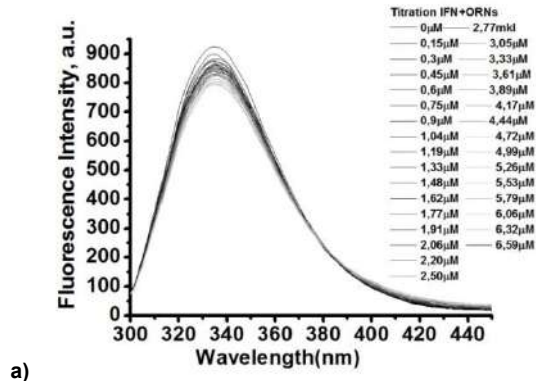
Кожна білкова структура може бути представлена точкою в цьому восьми-вимірному вторинному структурному просторі. Відстань між двома точками (x_i і x_i') визначається їх евклідовою відстані:

$$d = \sqrt{\sum_{i=1}^8 (x_i - x_i')^2}$$

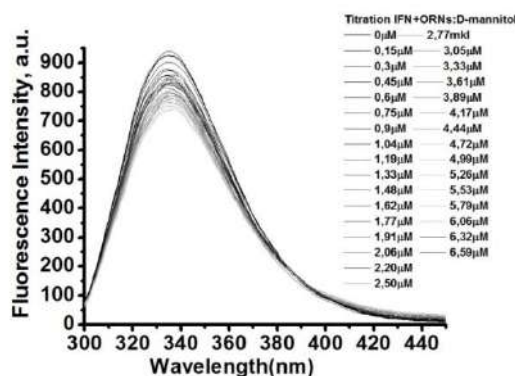
де x_i — вміст i -го вторинної структури білка x . Пошук найближчих структур здійснюється на всій базі із 71430 відомих структур (Miconnai et al., 2018). Гасіння флуоресценції широко використовують для вивчення зв'язування лігандів з білками (Kumar, 2011).

Результати та обговорення

В представлених на рис. 2. результатах спостерігається гасіння флуоресценції інтерферону при додаванні ОРН та комплексу ОРН з D-манітолом. Спектр флуоресценції білка демонструє один пік при 336 нм, що є ознакою білків цього типу. Спочатку спектри інтерферону ІНФ і ОРН або ОРН:D-манітоловий комплекс віднімають від спектрів ОРН або ОРН: D-манітол, з однаковими концентраціями в буфері.



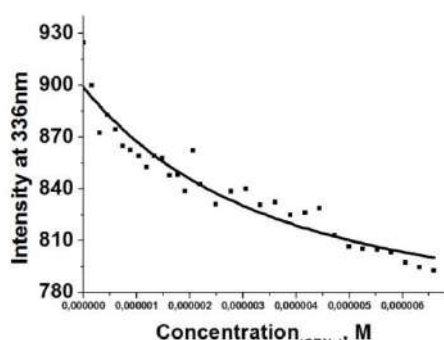
а)



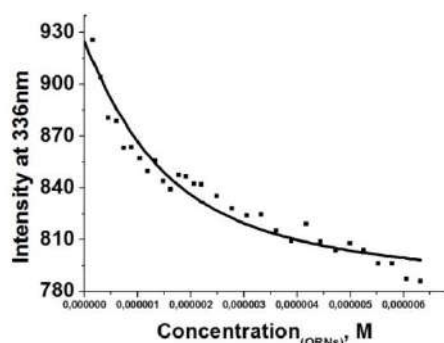
б)

Рис. 2. Спектри гасіння флуоресценції ІНФ при титруванні а) ОРН та б) ОРН:D-манітол.

Завдяки цьому дослідженню ми розрахували константу зв'язування білків лігандів. Встановлено, що константа зв'язування інтерферону α -2b з ОРН $K_d = 2,88 \cdot 10^{-6} \pm 1,14 \cdot 10^{-6}$ на порядок відрізняється від константи зв'язування при взаємодії інтерферону з комплексу ОРН:D-манітол $K_d = 9,2 \cdot 10^{-7} \pm 2,31 \cdot 10^{-7}$ (рис. 3.). Отримані результати можуть вказувати на кращу взаємодію комплексу ОРН: D-манітолу з білком, ніж ОРН. Це припущення підтверджується розрахунком констант дисоціації.



a)



б)

Рис. 3. Залежність гасіння інтенсивності флуоресценції ІНФ- α 2b від концентрації титранта: (а) ОРН, (б) ОРН:D-манітол.

Під час роботи було встановлено, що температура плавлення білка дорівнює 62 °С (рис. 4 та 5), а при додаванні титратів ОРН та комплексу ОРН з D-манітолом зміщується у бік підвищення температури 64 і 63,8 °С, що свідчить про невелику стабілізацію білка. Це може служити ще одним доказом того, що відповідні ліганди зв'язуються з білком і впливають на його конформацію та активність. Отримані результати, також свідчать про гасіння власної флуоресценції білків за рахунок перепоглинання молекулами олігонуклеотидів фотонів збудження флуоресценції протеїну. Можливе, також, перехоплення енергії електронного збудження триптофанових груп молекулами олігорибонуклеотидів. Можна припустити про утворення комплексів між ОРН та оптичними центрами протеїну, і, нарешті, можливий варіант, коли відбувається зміна конформації макромолекул протеїну під час контакту з ОРН.

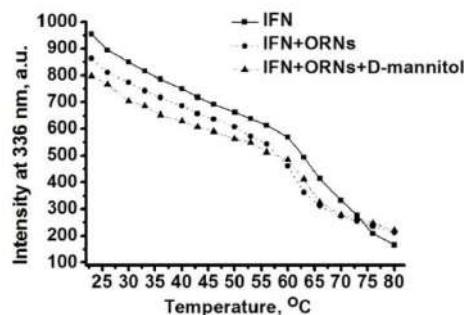
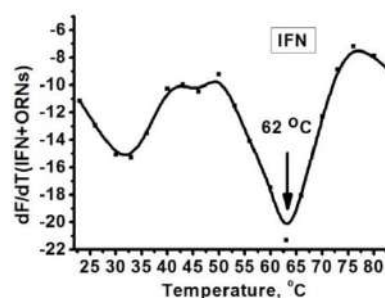
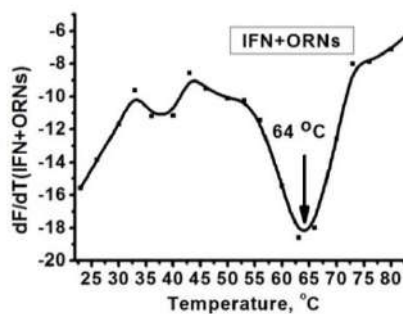


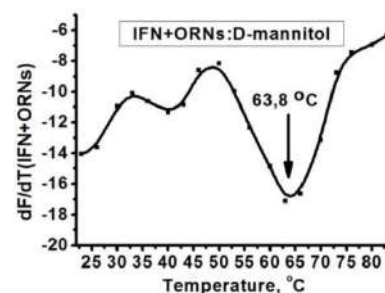
Рис. 4. Температурна залежність інтенсивності флуоресценції Інтерферону α -2b в максимумі довжини емісії 336 нм під впливом препаратів на основі ОРН.



a)



б)



в)

Рис. 5. Зміна термальної стабільності Інтерферону α -2b (а) під впливом ОРН (б) та (в) ОРН:D-манітол.

Для більш глибокого розуміння взаємодії інтерферону з молекулами олігорибонуклеотидів були проведені додаткові дослідження з використанням кругового дихроїзму.

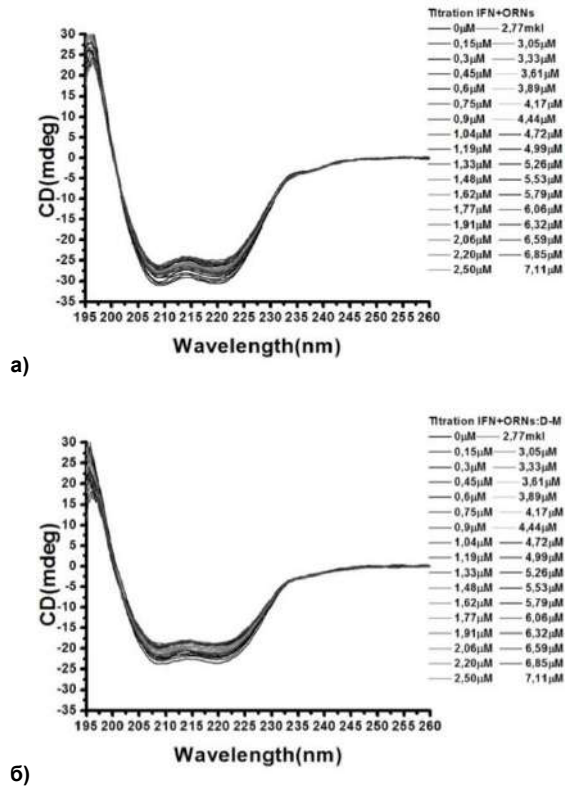


Рис. 6. Залежність еліптичності IFN α -2b від концентрації титрантів ОРН (а) та (а) ОРН:D-манітол.

Обраховані спектри використовували для встановлення вторинної та третинної структури у сервісі BeStSel. Аналіз зміни вторинної структури ІФН показав (рис. 6 та 7), що вихідний білок має у своїй структурі 22,2 % регулярних α -спіральних компонент, кінцевих α -спіральних ділянок 10,9 %, антипаралельних лівообернених β -листів 0 %, антипаралельних релаксованих β -листів 15,7 %, антипаралельних правообернених β -листів 13 %, паралельних β -листів 0 %, β -поворотів 8,7 % і неупорядкованих структур 29,6 %.

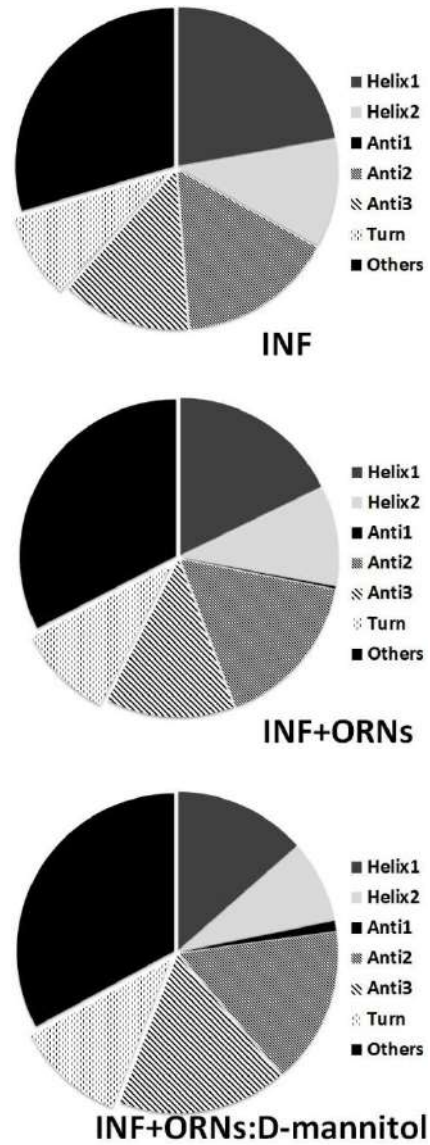


Рис. 7. Аналіз зміни вторинної структури ІФН під дією ОРН та ОРН:D-манітол. Helix1 — регулярні α -спіральні компоненти, Helix2 — кінцеві α -спіральні ділянки, Anti1 — антипаралельні лівообернені β -листи, Anti2 — антипаралельні релаксовані β -листи, Anti3 — антипаралельні правообернені β -листи, Parallel — паралельні β -листів, Turn — β -повороти і Others — неупорядковані структури.

При додаванні ОРН до ІФН у структурі білка виявлено 17,8 % регулярних α -спіральних компонент, кінцевих α -спіральних ділянок 10,1 %, антипаралельних лівообернених β -листів 0,2 %, антипаралельних релаксованих β -листів 16,2 %, антипаралельних правообернених β -листів 13,2 %, паралельних β -листів 0 %, β -поворотів 9,9 % і неупорядкованих структур 32,6 %. При

додаванні комплексів ОРН-D-манітолу у структурі ІНФ виявлено 13,5 % регулярних α -спіральних компонент, кінцевих α -спіральних ділянок 8,3 %, антипаралельних лівообернених β -листів 1 %, антипаралельних релаксованих β -листів 15,9 %, антипаралельних правообернених β -листів 17,2 %, паралельних β -листів 0 %, β -поворотів 11,1 % і неупорядкованих структур 32,9 %. Таким чином додавання ОРН та комплексу ОРН з D-манітолом призводить до зменшення вмісту α -спіральних компонентів в структурі білка та збільшення антипаралельних β -листів, β -поворотів та неструктурованих компонентів, причому за наявності D-манітолу зміна структури ІНФ відбувається більш інтенсивніше. У той же час, аналіз третинної структури ІНФ показує, що додавання комплексу ОРН: D-манітолу змінює архітектуру білка з 2-шарового сендвіча на альфа-бета-комплекс. На відміну від комплексу ОРН: D-манітолу, додавання ОРН не спричиняло жодних змін у третинній структурі білка.

Висновки

Отже, комплекси ОРН з D-манітолом мають значно більший вплив на конформацію та термічну стабільність інтерферону α -2b, аніж ОРН. Вірогідно це можна пояснити більш сильнішим та специфічним зв'язуванням цього комплексу з білком. Про це свідчить константа зв'язування інтерферону α -2b з ОРН $K_d = 2,88 \cdot 10^{-6} \pm 1,14 \cdot 10^{-6}$, яка на порядок відрізняється від константи зв'язування при взаємодії ІНФ з ОРН: D-манітол $K_d = 9,2 \cdot 10^{-7} \pm 2,31 \cdot 10^{-7}$. Також ОРН і ОРН з D-манітолом збільшують термічну стабілізацію інтерферону на 2 та 1,8 °C, відповідно. Додавання ОРН та ОРН з D-манітолом призводить до зменшення вмісту α -спіральних компонентів в структурі білка та збільшення антипаралельних β -листів, β -поворотів та неструктурованих компонентів, причому за наявності манітолу зміна структури ІНФ відбувається більш інтенсивніше. Додавання ОРН: D-манітол до білка, на відміну від ОРН змінює архітектуру третинної структури ІНФ від 2-х шарового сендвіча до альфа-бета-комплексу.

References

1. Balasubramanian V., Nguen L. T., Balasubramanian S. V., Ramanathan M. Interferon- γ -Inhibitory Oligodeoxynucleotides Alter the Conformation of Interferon- γ . *Mol. Pharm.* 1998. Vol. 53. P. 926–932. doi:0026-895X/98/050926-07\$3.00/0

2. Bates J., Kahlon B., Thomas D., Trent O., Miller D. Antiproliferative Activity of G-rich Oligonucleotides Correlates with Protein Binding *The Journal of Biological Chemistry* 1999. Vol. 274. P. 26369–26377. doi:10.1074/jbc.274.37.26369.
3. Kandagal P. B., Shaikh S. M. T., Manjunatha D. H. et al. Spectroscopic studies on the binding of bioactive phenothiazine compounds to human serum albumin. *J. Photochem. Photobiol A: Chem.* 2007. Vol. 189. P. 121–127. doi:10.1016/j.jphotochem.2007.01.021.
4. Kumar B., Guchhait N. Spectral deciphering of the binding interaction of an intramolecular charge transfer fluorescence probe with a cationic protein: thermodynamic analysis of the binding phenomenon combined with blind docking study. 2011. *Photochem. Photobiol. Sci.*, Vol. 10, P. 980–991. doi:10.1039/c0pp00309c.
5. Lakowicz J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd edition, *Springer Science: New York*. 2006. 954 p.
6. Malmgaard L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J. Interferon Cytokine Res.* 2004. Vol. 24. P. 439–454.
7. Micsonai A., Wien F., Bulyáki E., Kun J., Moussong E., Young-Ho L., Goto Y., Réfrégiers M. and Kardos J. BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46. P. 315–22. doi:10.1093/nar/gky497.
8. Tkachuk Z. Yu. 2'-5'-Oligoadenylates as a «tool» of innate immunity. *Biopolymers and cell.* 2013. Vol. 29. P. 266–276. doi:10.7124/bc.000821.

INFLUENCE OF OLIGORIBONUCLEOTIDES ON THE CONFORMATION AND STABILITY OF INTERFERON

R. O. Nikolaiev, M. M. Vivcharyk, S. I. Chernykh, Z. Yu. Tkachuk

Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine
Ukraine, 03143, Kyiv, Academician Zabolotny Str., 150
e-mail: romanfromukrain@gmail.com

Aim. To study the ability of yeast RNA oligoribonucleotides (ORNs) and their complexes with D-mannitol to influence the conformation and thermal stability of interferon (INF) α -2b. **Methods.** The ability of oligoribonucleotide drugs to bind to INF α -2b was studied using its fluorescence quenching method. The effect of ORN drugs on protein stability was studied by analyzing the thermal stability of INF. To confirm their influence on the conformation of the INF, we investigated the spectra of circular dichroism. **Results.** The ORN complexes with D-mannitol, due to their better protein binding, have been shown to have a much higher effect on the conformation and thermal stability of

interferon α -2b than ORN. ORNs and their complexes with D-mannitol also increase the thermal stabilization of interferon. The addition of ORN and ORN with D-mannitol to INF leads to a decrease in the content of α -helical components in the protein structure and an increase in β -components and unstructured parts of the protein molecule. Addition of the ORN complex: D-mannitol, unlike the ORN, changes the architecture of the tertiary INF structure. **Conclusions.** Therefore, the ORN complexes with D-mannitol have a much higher effect on the conformation and thermal stability of interferon α -2b than the parent drug ORN. The more specific binding of oligonucleotides can probably explain this in the presence of mannitol to the protein. ORNs and ORN complexes with D-mannitol also increase the

thermal stabilization of interferon by 2 and 1.8 °C, respectively. The addition of ORNs and ORN complexes with D-mannitol leads to a decrease in the content of α -helical components in the protein structure and an increase in antiparallel β -sheets, β -turns, and unstructured elements. In the presence of mannitol in the ORN molecule, the structure of INF changes more intensively. Addition of ORN complexes: D-mannitol to INF, unlike ORN, changes the architecture of the tertiary protein structure from a 2-layer sandwich to an alpha-beta complex.

Keywords: oligonucleotides; interferon; mannitol; secondary protein structure.