

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Скоробогатов Олександр Юрійович

УДК 577.32:577.112

**ВИВЧЕННЯ СТРУКТУРНИХ МЕХАНІЗМІВ ВЗАЄМОДІЇ
ДЕФОСФОРИЛЬОВАНИХ 2'-5'-ТРИАДЕНІЛАТІВ З БІЛКОМ S100A1**

03.00.03 – молекулярна біологія

АФТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ – 2020

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Науковий керівник: кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Ткачук Зеновій Юрійович
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
Кашуба Олена Віталіївна
Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України;

кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Векліч Тетяна Олександрівна
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Захист відбудеться «22» грудня 2020 року о 10³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою 03680, м. Київ-143, вул. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН (03143, м. Київ-143, вул. Заболотного, 150).

Автореферат розіслано « » листопада 2020 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої
ради, кандидат
біологічних наук, с.н.с.



I.V. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. На сьогодні відомо, що олігоаденілати відіграють ключову роль в так званому «олігоаденілатному шляху» активації інтерферону, механізм якого полягає в активації останнім ферменту 2'-5'-олігоаденілатсинтетази. Фермент, в свою чергу, використовує внутрішньоклітинний пул АТФ для синтезу особливого класу сполук – 2'-5'-олігоАп (n=2-6), серед яких кількісно переважають трьохчленні сполуки. В подальшому, олігоАп активують латентну РНКазу L, що здатна гідролізувати вірусні та матричні РНК [Pauwels et al, 1986]. Важливо, що здатність активувати фермент характерна лише для фосфорильованих олігоаденілатів, при чому їх афінність до РНКазу L зростає зі збільшенням кількості фосфатних груп олігоА [Torrence et al, 1988]. В той самий час, клітинний пул 2'-5'-олігоАп також містить і дефосфорильовані олігоаденілати, які утворюються в результаті ензиматичного відщеплення фосфатних груп. Біологічна роль дефосфорильованих олігоАп на сьогодні залишається незрозумілою.

Тим не менш, було встановлено деякі закономірності функціонування дефосфорильованого триаденілату (2'-5'-А₃). Зокрема, цілком закономірно було виявлено, що 2'-5'-А₃ мають виражені антивірусні властивості: природній 2'-5'-А₃ та його хімічно модифіковані аналоги виявили здатність інгібувати цілий ряд вірусних рестриктаз, в тому числі EcoRI [Tkachuk Z. Yu, 1989].

Крім того, було показано, що 2'-5'-А₃ здатен проявляти також і імуностимулюючу активність, в той час як його епоксі-модифікований аналог (2'-5'-А₃-еро) проявляє протилежну – імносупресуючу активність [Kozlov A. V, 1994].

Дефосфорильовані триаденілати також виявили здатність пригнічувати активність натрієвої, кальцієвої, калієвої та магнієвої АТФаз, що дозволяє припустити існування активності, схожої на анти-проліферативну [Rozhmayova O, 2006].

Крім того, – і це є найважливішим в об'єктиві задач і цілей даної роботи, – раніше було виявлено, що природній 2'-5'-А₃ та 2'-5'-А₃-еро здатні впливати на процес скорочення судин гладеньких м'язів *in vivo* [Filipov I. B., 2010]. Таку активність можна пояснити декількома шляхами, одним з яких є можлива взаємодія олігоаденілатів з деякими білками, що беруть участь у м'язовому скороченні, зокрема кальмодуліну (Calmodulin, CaM) та S100A1, та, як наслідок, модуляція їх активності певним чином.

І справді, можливість утворення комплексу олігоаденілат-CaM вже було раніше продемонстровано [Tkachuk Z. Yu, 2011]. Виявилось, що зв'язування олігоаденілату з кальмодуліном спричиняє зміни в афінності білка до іонів Ca²⁺. Ці дані дозволяють припустити, що олігоаденілати здатні взаємодіяти і з іншим ключовим Ca²⁺-зв'язуючим білком – S100A1, який, між іншим, є антагоністом кальмодуліну [Nathan T, 2008]. З цієї причини, вивчення особливостей взаємодії S100A1 із 2'-5'-А₃ було одним з головних завдань даної роботи.

Об'єктом дослідження в даній роботі був природній 2'-5'-A₃.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Зміст дисертації відповідає основному плану науково-дослідних робіт групи молекулярної фармакології відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Робота виконувалася в рамках тем наукових досліджень 2.2.4.15 «Вивчення механізму взаємодії 2',5' - олігоаденілатів з кальцій-зв'язуючими білками» (2009-2013), номер державної реєстрації 0108U008528; «Розробка та впровадження методів діагностики та експресії генів» (2013), номер державної реєстрації 0114U001100; 2.2.4.15 «Вивчення впливу олігонуклеотидів на сигнальні білки та експресію генів вродженого імунітету» (2018), номер державної реєстрації 0113U002779.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було дослідження структурних та функціональних зміни білка S100A1 при взаємодії з 2'-5'-A₃.

Для досягнення поставленої мети вирішували наступні завдання:

1. Отримати препарат рекомбінантного білка S100A1 людини високої чистоти.

2. Дослідити зміни відсоткового складу елементів вторинної структури білка S100A1 в апо- і голо-формах при зв'язуванні з препаратами 2'-5'-A₃ та 2'-5'-A₃-еро методом кругового дихроїзму.

3. Дослідити зміни Ca²⁺-зв'язуючої активності білка S100A1 у комплексі з еквімолярними концентраціями 2'-5'-A₃ та 2'-5'-A₃-еро.

4. Вивчити особливості впливу 2'-5'-A₃ та 2'-5'-A₃-еро на активність протеїнкінази Aurora *in vitro*.

Об'єкт дослідження: елементи вторинної структури та функціональний профіль білка S100A1 внаслідок взаємодії з 2'-5'-A₃.

Предмет дослідження: препарати рекомбінантних білків S100A1, S100B, кальмодуліну, природного та епосі-модифікованого корових 2'-5'-A₃.

Методи дослідження: мікробіологічні (культивування бактеріальних клітин), молекулярно-біологічні (створення конструктів), біохімічні (білковий гель-електрофорез), спектральні (КД спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія, ФТІР спектроскопія, ЯМР спектроскопія, SAXS спектроскопія). Також було застосовано метод комп'ютерного моделювання.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше було показано взаємодію 2'-5'-A₃ з рядом білків, а саме-Ca²⁺-зв'язуючі білки родини S100, кальмодулін та деякі протеїнкінази. Показано, що така взаємодія призводить не тільки до змін вторинної структури досліджених білків, але й до модифікації їх активності.

Практичне значення одержаних результатів. Результати проведених досліджень із вивчення механізмів біологічної дії 2'-5'-олігоА поглиблюють існуючі уявлення про функції корових аденілатів. Отримані в роботі дані можна використати для створення нових противірусних препаратів.

Особистий внесок здобувача. Результати, викладені у дисертації, одержано автором особисто або за безпосередньої його участі у виконанні експериментів. Зокрема, автором самостійно експресовано рекомбінантний

білок S100A1, отримано КД спектри, спектри флюоресценції, FTIR спектри, проведено комп'ютерне моделювання.

Планування та аналіз результатів експериментів та написання статей проведено спільно з науковим керівником, к.б.н. З.Ю. Ткачуком. Досліди, метою яких було отримання ЯМР спектрів, було проведено в межах співпраці з к.б.н. Жуковим Ігорем Юрійовичем (Інститут Біохімії та Біофізики ПАН, Варшава, Польща).

Апробація результатів дисертації. Загальні положення роботи доповідались на поточних наукових семінарах Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та 6 наукових конференціях: XII український біохімічний конгрес (Тернопіль, Україна, 2019), IX Conference of Young Scientists (Kyiv, Ukraine, 2015), Conference of Young Scientists (Kyiv, Ukraine, 2015), VII Conference of Young Scientists (Kyiv, Ukraine, 2014), VII Conference of Young Scientist (Kyiv, Ukraine, 2013), Young Scientists Forum FEBS (Saint Petersburg, Russia, 2013).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 5 статей у наукових фахових журналах та тези 6 доповідей у збірниках матеріалів з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення одержаних результатів, висновків та списку використаних джерел. Дисертацію викладено на 128 сторінках машинописного тексту. Вона містить 28 рисунків та 4 таблиці. Список використаної літератури налічує 195 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи досліджень. Об'єктами дослідження в даній роботі виступали рекомбінантний білок S100A1 людини та штучні синтезовані дефосфорильовані триаденілати – природний 2'-5'-A₃ та його епосі-модифікований аналог – 2'-5'-A₃-еро. Серед інших об'єктів були комерційно доступні ліофілізовані препарати протеїн кінази Аврора (Aurora).

Для отримання рекомбінантного білка S100A1 використовували стандартну процедуру індукції синтезу протеїна в бактеріальних клітинах *E.coli* штаму BL21DE3, після чого їх лізис та очищували та від залишків бактеріальних клітин. Надалі застосовували багатоступеневий процес очистки, який включав “висолювання” за допомогою сульфату амонію, афінну хроматографію із застосуванням сефарози, а також рідинну хроматографію під високим тиском. Очищений таким чином рекомбінантний білок ліофілізували для довгострокового зберігання.

Природний дефосфорильований триаденілат та його епосі-модифікований аналог було отримано в процесі складного багатостадійного хімічного синтезу.

Результати досліджень та їх обговорення.

Синтез рекомбінантного білка S100A1.

Експресію та очистку рекомбінантного білка S100A1 проводили за розробленою раніше методикою. Для індукції цільових рекомбінантних білків використовували клітини *E. coli* штаму BL21(DE3).

Наявність цільового білка S100A1 у фракціях після хроматографії та чистоту отриманих препаратів підтверджували за допомогою SDS-поліакриламідного гелю електрофорезу і фарбуванням Coomassie blue (рис. 1).

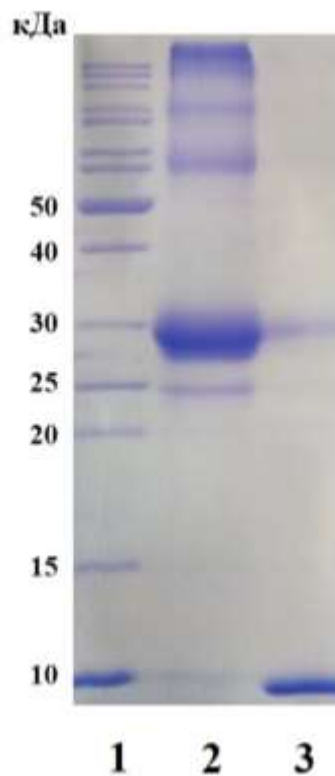


Рис. 1. Електрофоретичний контроль чистоти отриманого білкового препарату: 1 – білковий маркер, 2 – контрольний препарат рекомбінантного білка EGFP, 3 – препарат рекомбінантного білка S100A1

Комп'ютерне моделювання взаємодії S100A1 з 2'-5'-A₃. Моделювання зв'язування S100A1 з 2'-5'-A₃ було проведено з метою отримання даних щодо амінокислотних залишків білка S100A1, які взаємодіють з 2'-5'-A₃ шляхом утворенням водневих або електростатичних зв'язків (рис 2).

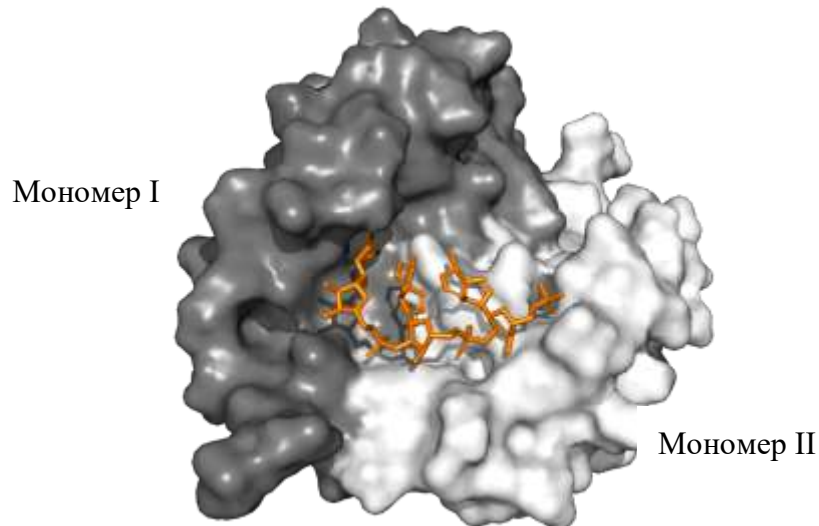


Рис. 2. Комплекс гетеродимеру S100A1 з 2'-5'-A₃. Поверхнєве представлення білкової глобули з паличковою моделлю 2'-5'-A₃. 2'-5'-A₃ взаємодіє з міжмономерним інтерфейсом S100A1

Проведений експеримент свідчить про те, що 2'-5'-A₃ утворює 3 зв'язки з трьома різними амінокислотними залишками в радіусі 5Å. Один з них – водневий – утворюється між NH₂ групою залишку аденіну 1-ого залишку АМФ та СО групою Ала80. Другий та третій зв'язки – електростатичні. Вони утворюються між PO₂ групою 2-ого залишку АМФ та СО групою Вал69 та між PO₂- групою 3-ого залишку АМФ та СО групою Асн64.

Не можна стверджувати, що утворення трьох вищеописаних міжмолекулярних зв'язків свідчить про наявність специфічного до 2'-5'-A₃ сайту зв'язування на поверхні S100A1, не варто. Більш вірогідно, що взаємодія S100A1-2'-5'-A₃ неспецифічна, доказом чого слугує високе значення константи зв'язування – $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.

В результаті комп'ютерного моделювання зв'язування 2'-5'-A₃ з S100A1, вдалося частково пояснити раніше отримані результати ЯМР: PO₂ група II залишку АМФ та СО група Вал69 взаємодіють електростатично, що пояснює суттєвий хімічний зсув амінокислотного залишку. Вал69 є частиною C-кінцевого домену Ca²⁺-зв'язуючого домену білка S100A1, при взаємодії з лігандом може змінювати профіль зв'язування іонів Ca²⁺, що і було нами показано.

Вивчення впливу 2'-5'-A₃ та 2'-5'-A₃-еро на значення константи асоціації білка S100A1 із іонами Ca²⁺ методом флуоресцентної спектроскопії. В результаті проведених дослідів виявилось, що при додаванні розчину CaCl₂ до розчину білка S100A1 відбувається підвищення інтенсивності флуоресценції ароматичних амінокислотних залишків (головним чином Trp 90), що пояснюється суттєвими конформаційними перебудовами, в результаті яких білкова глобула, представлена гомодимером субодиниць S100A1, частково розплітається, вивільнюючи при цьому гідрофобну ділянку, яка містить залишки ароматичних амінокислот. Інтенсивність флуоресценції білка підвищується в результаті збільшення площі поверхні ароматичних залишків, що контактує з розчинником. Відомо, що білок S100A1 не має високої спорідненості до іонів двовалентного кальцію у порівнянні, наприклад, з кальмодуліном. Титрування протеїна S100A1 розчином CaCl₂ призводить до поступового росту інтенсивності флуоресценції, причому крива насичення не має яскраво вираженої сигмоїдальної форми (рис. 3).

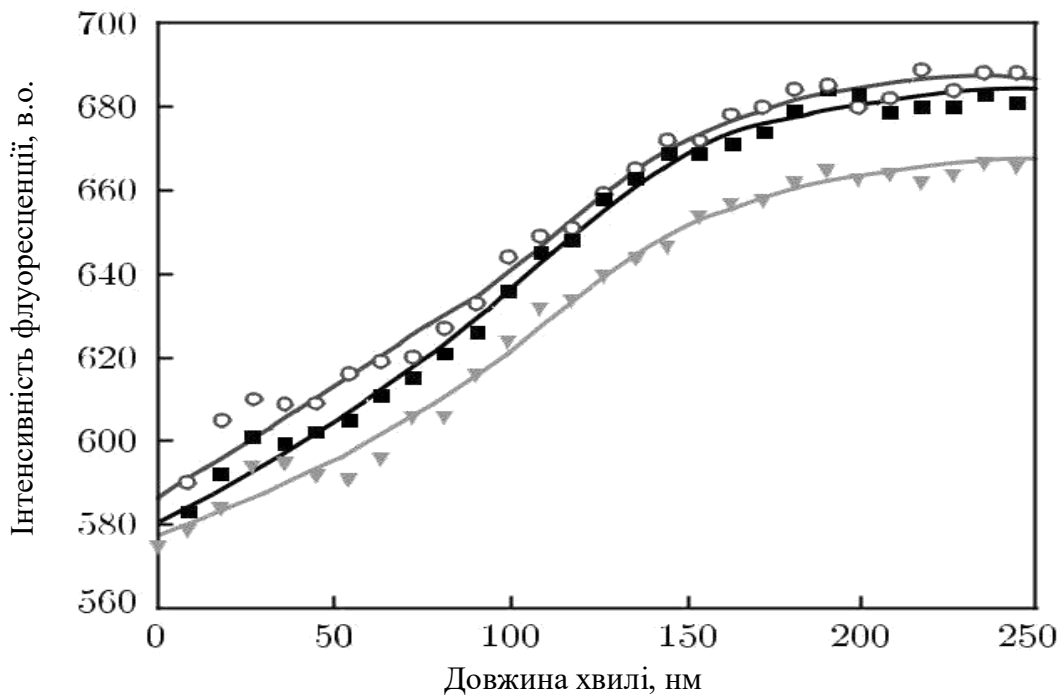


Рис. 3. Криві титрування білка S100A1 (■) розчином CaCl₂ в присутності 2'-5'-A₃ (▼) та 2'-5'-A₃-еро (○). Концентрації білка S100A1 та відповідного олігоаденілату в розчині становили 8 мкМ

Вихід кривої насичення на «плато» відображає момент насичення обох Ca²⁺-зв'язуючих EF-мотивів в складі гомодимеру S100A1 іонами Ca²⁺, та припинення конформаційних змін, які виникли при переході молекули білка в «розгорнутий» стан (holo-S100A1).

Дані експерименти показали, що 2'-5'-A₃ суттєво не впливає на спорідненість іонів кальцію до гомодимеру S100A1, при чому вплив немодифікованого 2'-5'-A₃ характеризується зниженням спорідненості іонів Ca²⁺ до білка S100A1 на $0,2 \cdot 10^3$, що є статистично недостовірним, враховуючи похибку $\pm 0,36 \cdot 10^3$. Епоксі модифікований аналог 2'-5'-A₃ підвищує константу асоціації на $0,8 \cdot 10^3$ у порівнянні з білком без додавання титрантів, що є статистично достовірним, враховуючи похибку $0,78 \cdot 10^3$.

Дослідження змін відсоткового складу елементів вторинної структури білка S100A1 внаслідок взаємодії із 2'-5'-A₃ та 2'-5'-A₃-еро. КД спектри апо-форм білків S100A1 та S100B, записані в області довжин хвиль 260-200 нм, характеризувалися двома мінімумами на 222 та 208 нм, що є типовим для білків, серед елементів вторинної структури яких присутні, головним чином, альфа-спіральні домени (рис. 4). Як було показано раніше, тривимірна структура білків S100A1 та S100B представлена 4 довгими альфа-спіралями та двома антипаралельними бета-складками в С-кінцевій частині обох Ca²⁺-зв'язуючих петель.

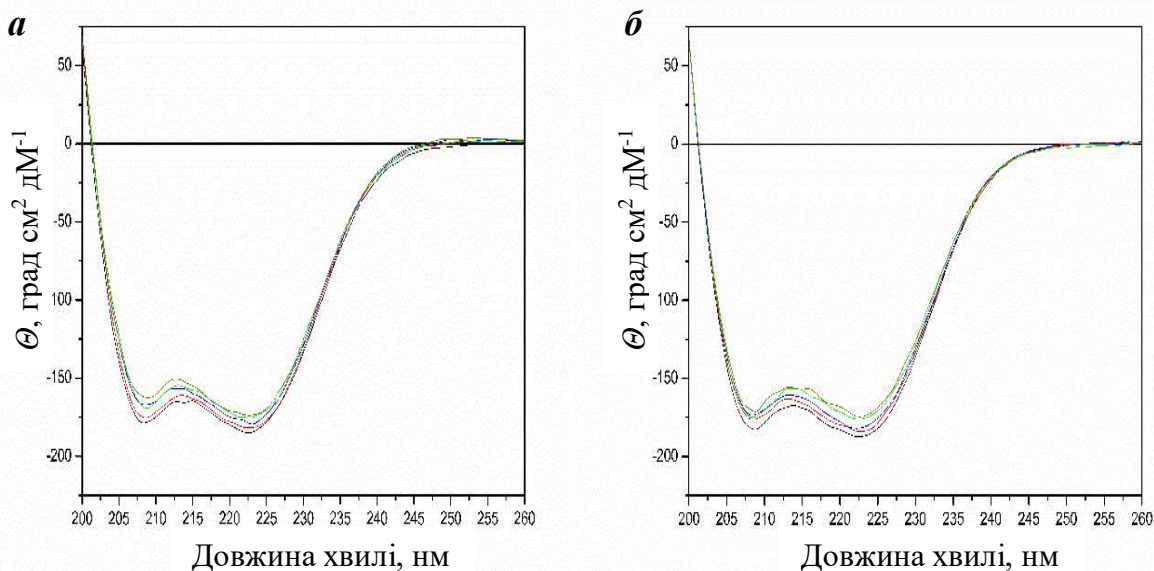


Рис. 4. КД спектри білка S100A1-аро (чорна крива) в концентрації 8 мкМ та його комплексів з 2'-5'-A₃-еро (а) та 2'-5'-A₃ (б). Кольорові криві відповідають комплексам білку з відповідним олігоаденілатом у концентрації 8 мкМ (червона крива), 24 мкМ (синя крива), 40 мкМ (зелена крива) та 56 мкМ (темно-жовта крива)

Обидва досліджені олігоаденілати впливали на відсотковий склад вторинних елементів білка аро-S100A1 подібним чином, причому різницею можна і треба знехтувати. Зміни, що виникали в holo-S100A1, помітно (в межах досліджу) відрізнялися від таких аро-S100A1. Пояснити цей ефект на даному етапі досліджень досить важко – скоріш за все, сайти зв'язування

олігоаденілатів на поверхні аро- і голо-форм білка S100A1 відрізняються і є найважливішим фактором, пояснюючим такі зміни.

Вивчення впливу 2'-5'-A₃ на структуру S100A1 методом ядерно-магнітного резонансу. Метод ЯМР спектроскопії було застосовано з метою ідентифікації амінокислотних залишків, які безпосередньо «реагують» на утворення комплексу S100A1-2'-5'-A₃ зміною резонансної частоти магнітного поля бічних фрагментів відповідних амінокислотних залишків.

Аналіз отриманих ¹H та ¹N HSQC ЯМР груп даних виявив ряд амінокислотних залишків, що продемонстрували більші, відносно інших, значення хімічних зсувів амідних груп (рис. 5, 6).

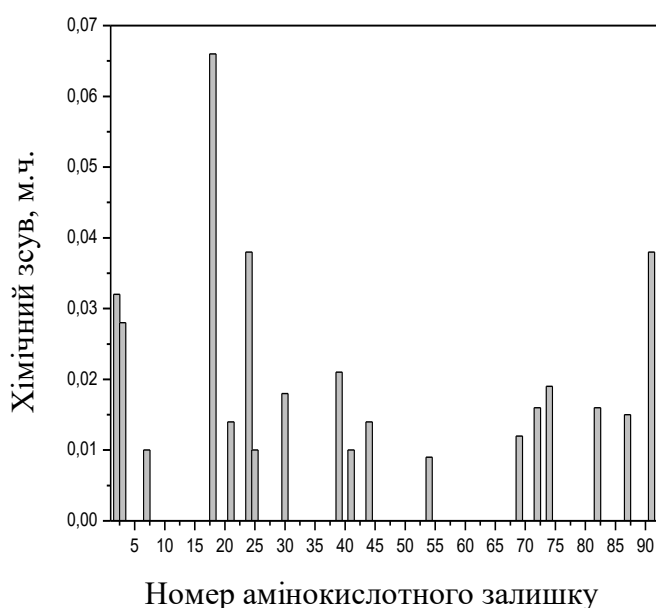


Рис. 5. Стовпчикова діаграма залежності значення хімічного зсуву від номеру амінокислотного залишку при титруванні S100A1 розчином 2'-5'-A₃. Наведено лише амінокислотні залишки з високими значеннями величин хімічних зсувів

Виявилось, що амінокислотні залишки із найбільш суттєвими значеннями хімічних зсувів знаходяться в межах Ca²⁺-зв'язуючих петель – центральних частин EF-hand доменів. Більшість сигналів надходила від N-кінцевого регіону Ca²⁺-зв'язуючого мотиву, який в своєму складі містить наступні амінокислотні залишки: Гіс18, Ліз21, Асп24, Ліз25 та Ліз30, що характеризуються сильною залежністю від умов проведення експерименту, а саме температури, рН та/або іонної сили розчину.

Амінокислотні залишки, Вал69 та Глн72, в межах C-кінцевого домену білка S100A1, продемонстрували значно нижчі значення хімічних зсувів в результаті зв'язування з 2'-5'-A₃ (рис. 6).

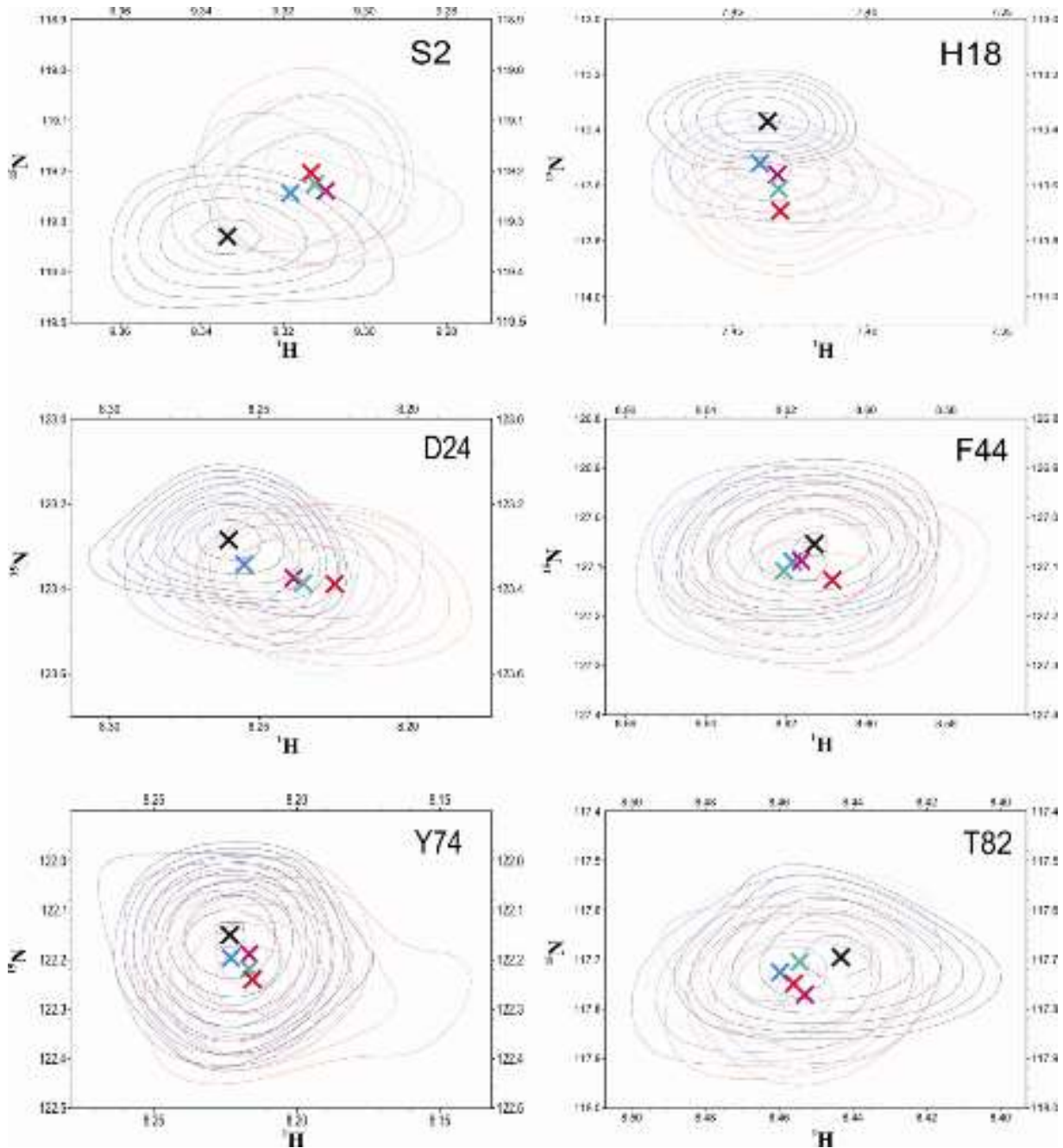


Рис. 6. Значення хімічних зсувів, отримані в ході двовимірного 2D ^1H - ^{15}N HSQC експерименту для двоміченого ^{13}C , ^{15}N -апо-S100A1 людини для деяких амінокислотних залишків при додаванні 10 мкл 130 мМ розчину 2'-5'- A_3

В зв'язку з невисоким значенням доступності перерахованих вище амінокислотних залишків до взаємодії з розчинником, скоріш за все, молекула 2'-5'- A_3 не має змоги напряму зв'язатися з цими залишками. Набагато більш вірогідним є сценарій, за якого молекула олігоаденілату приєднується до S100A1 в іншому місці (скоріш за все в районі Ca^{2+} -зв'язуючого домену та/або лінкерного регіону) а конформаційні зміни, викликані його приєднанням, передаються на чутливий до подібних змін міжмономерний інтерфейс (рис. 7).

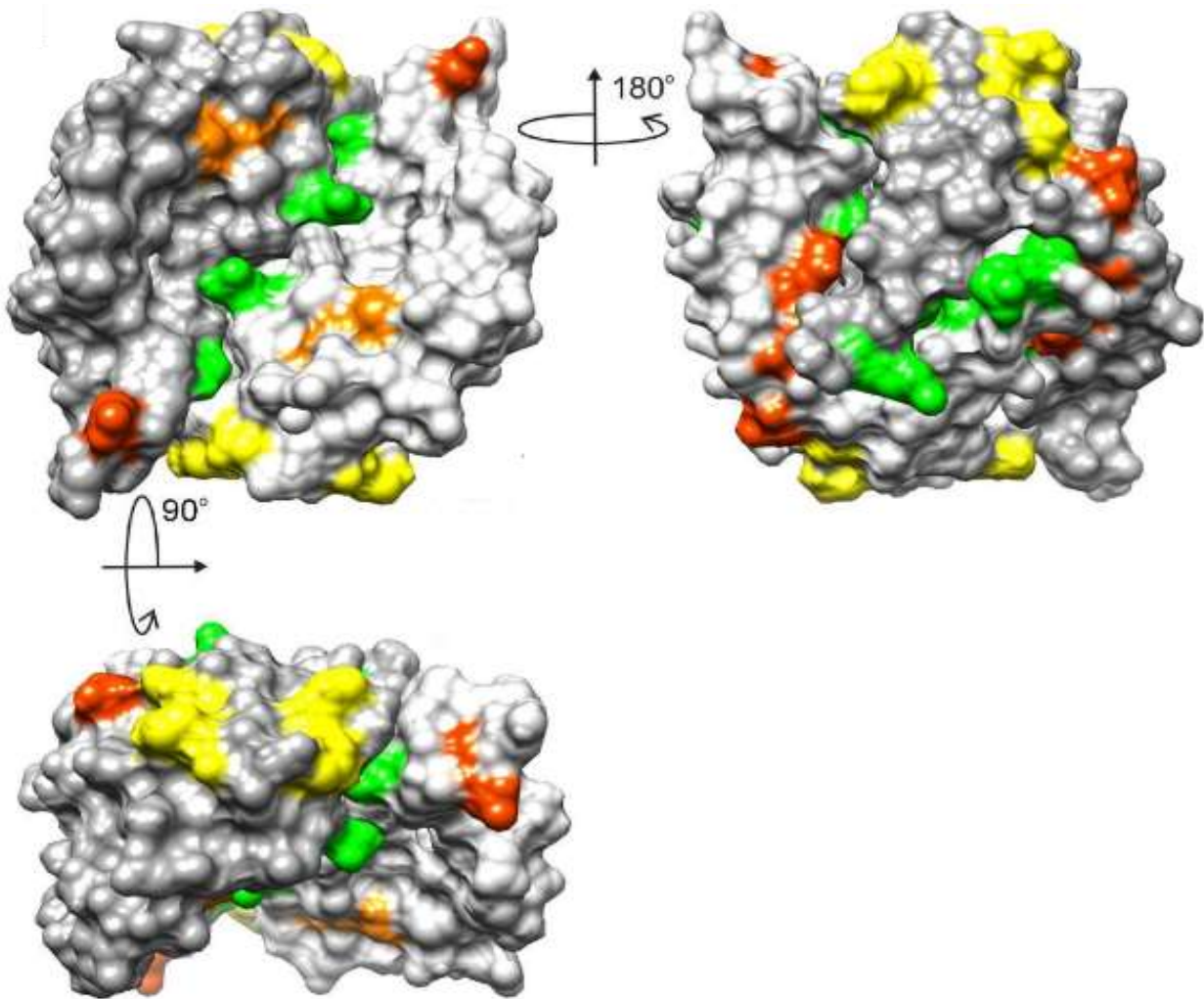


Рис. 7. Тривимірна структура білка апо-S100A1 людини (2LLU), сгенерована після проведення ЯМР дослідів. Амінокислотні залишки, значення хімічних зсувів яких мали найвищі значення, відображено відповідними кольорами: жовтим – Гіс18, Ліз21, Асп24, Ліз25 (N-кінцевий домен Ca^{2+} -зв'язуючого домену), помаранчевим – Вал69, Глн72 (C-кінцевий домен Ca^{2+} -зв'язуючого домену), червоним – Глу39, Лей41, Фен44, Глу91 (C-кінцевий фрагмент альфа-спіралі IV), зеленим – Сер2, Глу3, Ала7, Вал54, Тир74, Тре82, Асн87 (міжмономерний інтерфейс)

Вплив 2'-5'-Аз на активність протеїнкіназ. В досліді використовували 2'-5'-Аз та його аналоги, в яких 3'-кінцевим нуклеозидом виступав епоксиаденозин та 8-аміноаденозин, тобто аденозин, модифікований відповідно по вуглеводному фрагменту чи по гетероциклічній основі. Вивчали вплив цих препаратів на активність протеїнкіназ (ПК) FGFR, TIE2, ROCK1, Aurora, JNK1, CK2 та ASK в модельній тест-системі, причому визначали кількість продукту ферментативної реакції. Пряме визначення ґрунтувалося на фосфорилуванні ферментами короткого пептидного субстрату RRREEETEEE у присутності радіоактивно міченого АТФ.

З побудованих кривих титрування було визначено величини IC_{50} олігоаденілатів, тобто концентрацію сполуки, при якій активність ферменту

інгібується на 50%. Активніші препарати мають менше значення IC_{50} . Вища активність препарату дозволяє використовувати меншу діючу концентрацію і знизити ризик розвитку побічних ефектів. Було встановлено, що величина IC_{50} у зоні низьких концентрацій для 2'-5'- A_3 становить 19.3 мкМ, а для 2'-5'- A_3 -еро 11.6 мкМ у присутності 100 мкМ АТФ. Таким чином, епоксиданалог 2'-5'- A_3 -еро має значно більшу інгібуючу дію при низьких концентраціях, ніж природний 2'-5'- A_3 . Оскільки криві титрування носять V-подібний характер, то можна визначити й інше значення IC_{50} , що досягається при вищих концентраціях: для 2'-5'- A_3 та 2'-5'- A_3 -еро цей показник становить відповідно 23.8 та ~85 мкМ. При концентрації АТФ 25 мкМ жоден з препаратів не зміг досягнути 50%-го інгібування ПК Ауогоа у дослідженому діапазоні концентрацій (рис. 8).

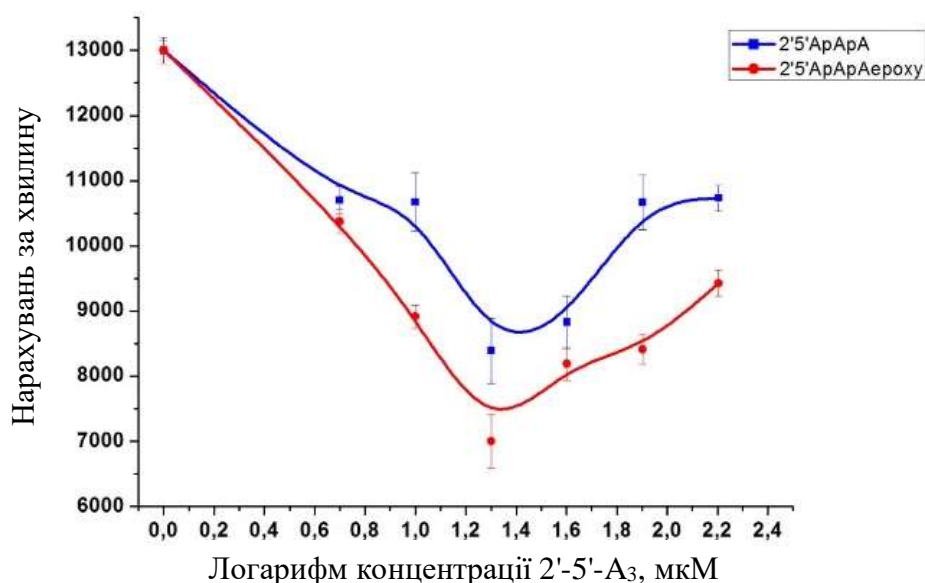


Рис. 8. Залежність активності кінази Аврора від концентрації 2'-5'- A_3 та 2'-5'- A_3 -еро. Концентрація АТФ становила 100 мкМ

Як видно з отриманих результатів (таблиця 1), різні ПК по-різному реагують на досліджувані сполуки. У більшості випадків препарати стимулюють активність ПК, проте спостерігається й пригнічення. Як видно з таблиці 1, природний 2'-5'- A_3 в основному активує кінази, при цьому особливо сильно (на 84%) зростає активність ПК СК2. Помірно активуються ферменти JNK1 і ROCK1 (відповідно на 31 і 40%). У межах 18–25% активуються TIE2, ASK і FGFR. Навпаки, щодо Ауогоа природний 2'-5'- A_3 виявляє протилежний ефект (35% інгібування).

Таблиця 1.

Вплив 2'-5'-A₃ та його аналогів на активність протеїнкіназ*

Препарат	Активність протеїнкіназ, % відносно контролю**						
	CK2	FGFR	TIE2	ROCK1	JNK1	Aurora	ASK
2'-5'A ₃	184	125	118	140	131	65	122
2'-5'ероA ₃	196	134	76	160	172	60	145
2'-5'aminoA ₃	88		110			35	79

Пріітки: 1. * - концентрація олігоаденілатів 66 мкМ, АТФ – 50 мкМ;

2. ** контроль 100% (реакція за відсутності препаратів 2'-5'-олігоаденілатів)

Таким чином, наведені дані свідчать про те, що 2'-5'-олігоаденілати істотно впливають на активність ПК, причому можуть виступати як інгібіторами, так і активаторами останніх, залежно від ферменту та природи препарату. При цьому їх дія на активність ПК залежить від концентрації препаратів та АТФ. Отже, досліджені олігоаденілати 2'-5'-A₃ та 2'-5'-A₃-еро здатні змінювати активність протеїнкінази Аврора і, таким чином, впливати на перебіг клітинних процесів, включаючись у систему сигнальних шляхів клітини.

Структурні зміни в терапевтичних РНК, створених на основі 2'-5'-A₃, під впливом температури. Отримані експериментальні результати свідчать про те, що температура плавлення препарату «RNA» становила 45.5°C. Ми вважаємо, що спостерігати такий ефект було можливо за рахунок наявності серед молекул РНК великої кількості двоспіральних ділянок. Зразок “Nuclex”, представлений гетерегонною сумішю олігоаденілатів різної довжини (від 3 до 25 основ), серед яких, згідно наших припущень, присутні і 2'-5'-триаденілати, поведив себе інакше (рис. 9) – його оптична густина зменшувалася при підвищенні температури, що може бути свідченням складної організації молекул даного зразка.

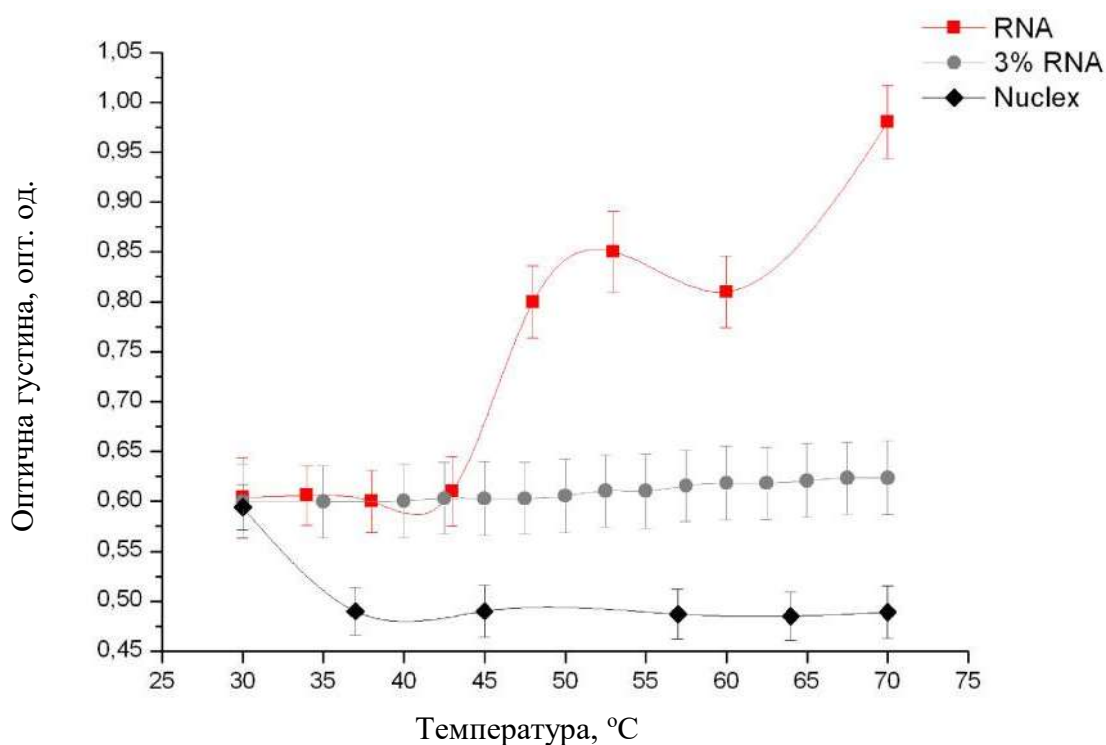


Рис. 9. Залежність оптичної густини зразків РНК від температури

Зважаючи на те, що в складі зразку «Nuclex» міститься спирт манітол, молекула якого включає велику кількість гідроксильних груп, відбувалася зміна полярності розчинника, в результаті чого відбувалася дегідратація полімеру та зміна поверхневого заряду. Ми вважаємо, що молекули цього зразку формували більш компактні у порівнянні з іншими досліджуваними зразками структури – молекулярні асоціати, структура яких утримувалася, головним чином, завдяки електростатичним взаємодіям.

Дослідження залежності розміру частинок в розчинах досліджуваних зразків частково підтвердили висунуті раніше припущення (рис. 10). З підвищенням температури, досліджувані зразки проявили схильність до дестабілізації, в результаті чого середній розмір частинок в розчині зменшувався. Серед зразків вдалося зафіксувати частинки різних розмірів. Поступове підвищення температури призводило до руйнування макромолекулярних асоціатів, представлених часточками різних розмірів.

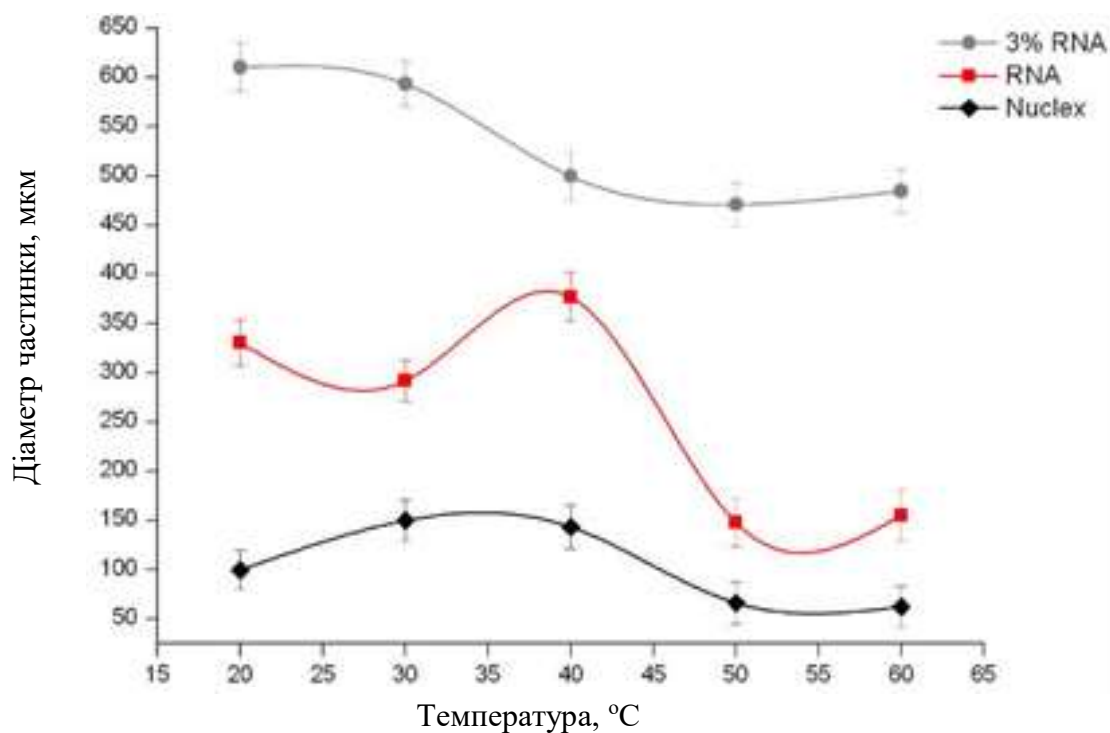


Рис. 10. Залежність діаметру частинок в зразках РНК від температури

Ми вважаємо, що мікрооточення молекул РНК, які слугували в якості головного компонента досліджуваних препаратів, не тільки впливало на структуру біополімеру, але і змінювало їх біологічні та терапевтичні характеристики. Так, зменшення величини поверхневого заряду терапевтично значущої молекули може підвищувати здатність до проникнення всередину клітини та/або стійкість до нуклеаз.

ВИСНОВКИ

Досліджено вплив 2'-5'-A₃ на вторинну структуру і Ca²⁺-зв'язуючу активність протеїна S100A1, а також на активність ряду протеїнкіназ.

1. Показано утворення комплексу між 2'-5'-A₃/2'-5'-A₃-еро і протеїном S100A1, що підтверджено характерними змінами спектрів КД комплексів 2'-5'-A₃-S100A1 та 2'-5'-A₃-еро-S100A1. Показано, що комплекс утворюється як за умов присутності так і у відсутності іонів Ca²⁺ в реактивній суміші.

2. Виявлено, що як 2'-5'-A₃ так і 2'-5'-A₃-еро здатні впливати на відсотковий склад вторинних елементів білка аро-S100A1, причому зменшується кількість альфа-спіральных елементів на 6% і 5%, відповідно. У випадку голо-форми S100A1 також спостерігали зменшення відсотку альфа-спіральных елементів на 3% та 4%, відповідно. Таким чином, 2'-5'-A₃ і 2'-5'-A₃-еро впливали на кількість альфа-спіральных елементів майже однаково, причому наявність в реакційній суміші іонів Ca²⁺ не впливала на ефективність утворення комплексів 2'-5'-A₃/2'-5'-A₃-еро-S100A1.

3. Методом ІЧПФ було показано, що зв'язування 2'-5'-A₃ викликало зміщення амідних смуг Amide I, II інфрачервоного спектру білка S100A1 у високохвильову область на 1 та 3 см⁻¹, що свідчить про зростання кількості неупорядкованих елементів білка S100A1.

4. Методом ЯМР було виявлено значні хімічні зсуви амінокислотних залишків в структурно та функціонально важливих ділянках білка S100A1, серед яких N-кінцевий Ca²⁺-зв'язуючий домен, C-кінцевий Ca²⁺-зв'язуючий домен, альфа-спіраль IV та міжмономерний інтерфейс, на основі чого було зроблено припущення щодо амінокислотних залишків, з якими безпосередньо взаємодіє 2'-5'-A₃. Показано, що 2'-5'-A₃ взаємодіє із протеїном S100A1 в межах N-кінцевого Ca²⁺-зв'язуючого домену та лінкерного регіону.

5. Методом комп'ютерного моделювання взаємодії 2'-5'-A₃ із S100A1, підтвержено результати, отримані раніше за допомогою ЯМР – PO₂- група II залишку АМФ та СО група Вал69 взаємодіють електростатично, що може пояснювати суттєвий хімічний зсув амінокислотного залишку. Вал69 є частиною C-кінцевого домену Ca²⁺-зв'язуючого домену білка S100A1.

6. Методом флюоресцентної спектроскопії було показано, що 2'-5'-A₃ суттєво не впливають на спорідненість іонів кальцію до гомодимеру S100A1, причому вплив немодифікованого 2'-5'-A₃ характеризується зниженням спорідненості іонів Ca²⁺ до білка S100A1 на 0.2·10⁻⁴. Епокси модифікований аналог 2'-5'-A₃ підвищує константу асоціації на 0.8·10⁻³ у порівнянні з білком без додавання титрантів.

7. Досліджено вплив 2'-5'-A₃ і 2'-5'-A₃-еро на активність ряду модельних протеїнкіназ, в тому числі протеїнкінази Аврора, активність якої інгібувалася олігоаденілатами на 35 та 40 % відсотків, відповідно.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Скоробогатов О. Ю.**, Жуков О. Ю., Ткачук З. Ю. Структурні механізми взаємодії дефосфорильованих 2'-5'-триаденілатів з білком S100A1 // Допов. Нац. акад. наук Укр. – 2020. – № 1. – С. 89-94. *Особистий внесок здобувача – комп'ютерне моделювання взаємодії 2'-5'-триаденілатів з білком S100A1, візуалізація та аналіз отриманих результатів.*

2. **Skorobogatov OY**, Kukharenko AP, Kozlov OV, Dubey IY and Tkachuk ZY. 2'-5'-Linked Triadenylates Act as Protein Kinase Activity Modulators // Journal of Proteomics & Bioinformatics. – 2017. – Vol. 10, №12. – P. 320-323. *Особистий внесок здобувача – комп'ютерне моделювання взаємодії 2'-5'-триаденілатів з протеїнкіназою A, ідентифікація амінокислотних залишків, безпосередньо задіяних у взаємодії.*

3. **О. Ю. Скоробогатов**, І.Ю. Жуков, З.Ю. Ткачук. 2',5'-олігоаденілати змінюють вторинну структуру та функціональну активність білка S100A1 людини // Допов. Нац. акад. наук Укр. – 2015. – № 3. – С. 157-160. *Особистий внесок здобувача – отримання спектрів флуоресценції комплексів 2'-5'-триаденілатів з білком S100A1, розрахунок значень констант зв'язування 2'-5'-триаденілатів з S100A1.*

4. **Skorobogatov O. Yu.**, Lozhko D. N., Zhukov I. Yu., Kozlov O. V., Tkachuk Z. Yu. Study of dephosphorylated 2'-5'-linked oligoadenylates impact on apo-S100A1 protein conformation by heteronuclear NMR and circular dichroism. // Biopolym. Cell. – 2014. – Vol. 30, № 4. – P. 279-285. *Особистий внесок здобувача – експресії та очистка препарату рекомбінантного білка S100A1, отримання спектрів кругового дихроїзму, їх обробка та аналіз.*

5. Z. Yu. Tkachuk, A. V. Kozlov, **O. Yu. Skorobogatov**. Structural Changes in Therapeutic RNAs / Macromolecular Symposia. – 2014. – Vol 335, № 1. – P. 17-19. *Особистий внесок здобувача – проведення спектрофотометричного плавлення препаратів РНК, в т. ч. Нуклексу та аргінуку.*

6. **О. Ю.Скоробогатов**, І.Ю.Жуков, З.Ю.Ткачук. Вивчення взаємодії дефосфорильованого 2'-5'-триаденілату з протеїном S100A1 людини. Матеріали XII українського біохімічного конгресу, Медична та клінічна хімія. – Тернопіль, Україна. – 2019. – Т. 21, №3. – С. 45.

7. **Skorobogatov Oleksandr Yu.**, Gajda M., Zhukov Igor Yu., Tkachuk Zenoviy Yu. Study on 2'-5'A3 binding to human protein S100A1 // Abstracts of IX Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. – 2015. – Vol. 31 (Special Issue). – P. 11.

8. **O. Skorobogatov**, I. Zhukov, O. Kozlov, P. Gajda, Z. Tkachuk. 2'-5'-linked oligoadenylates alter the conformation of human S100A1 protein and its functional profile // Abstracts of Conference for Young Scientists. - Kiev, Ukraine. – 2015. – P.35.

9. **O. Yu. Skorobogatov**, I. Yu. Zhukov, Z. Yu. Tkachuk. Expression of recombinant human Calmodulin in insect cells and its purification // Abstracts of VIII

Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. – 2014. – Vol. 30 (Special Issue). – P. 19.

10. **Oleksandr Yu. Skorobogatov**, Igor Yu. Zhukov, Zenoviy Yu. Tkachuk. 2'-5'-linked oligoadenylates alter the conformation of S100A1 and S100B proteins // Abstracts of VII Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29(Special Issue). – P. 25.

11. **Oleksandr Skorobogatov**, Igor Zhukov and Zenoviy Tkachuk. 2'-5'a3 and its analogue alter s100a1 conformation and Ca²⁺ binding profile // Book of abstracts of Young Scientists Forum. FEBS. – Saint Petersburg, Russia. – 2013. – P.114.

АННОТАЦІЯ

Скоробогатов О.Ю. Вивчення механізмів взаємодії дефосфорилованих 2'-5'-триаденілатів з білком S100A1 – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2020.

Дисертацію присвячено вивченню механізмів взаємодії дефосфорилованих 2'-5'-триаденілатів із Ca^{2+} -зв'язуючим білком S100A1 людини *in vitro*. Вперше встановлено, що утворення комплексу між цими сполуками призводить до кількісних змін складу елементів вторинної структури білка S100A1, зменшуючи відсоток альфа-спіральних елементів та збільшуючи кількість неупорядкованих елементів вторинної структури. Показано, що, окрім впливу на структуру S100A1, 2'-5'-триаденілати несуттєво змінюють константу дисоціації між іонами Ca^{2+} та S100A1. Було виявлено амінокислотні залишки, що безпосередньо задіяні у взаємодії між 2'-5'-триаденілатом та білком S100A1. Беручи до уваги описану раніше властивість 2'-5'-триаденілатів стимулювати м'язове скорочення *in vivo*, було зроблено припущення щодо можливого механізму цього феномену, суть якого полягає у безпосередній взаємодії 2'-5'-триаденілатів із протеїном S100A1, структурні та функціональні зміни в складі якого опосередковано впливають на подальшу взаємодію S100A1 з ріанодиноним рецептором.

Ключові слова: 2'-5'-триаденілати, S100A1, структурні зміни.

АННОТАЦІЯ

Скоробогатов О.Ю. Изучение механизмов взаимодействия дефосфорилированных 2'-5'-триаденилатов с белком S100A1. - Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 - молекулярная биология. - Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2020.

Диссертация посвящена изучению механизмов взаимодействия дефосфорилированных 2'-5'-триаденилатов с Ca^{2+} -связующим белком S100A1 человека *in vitro*. Впервые установлено, что образование комплекса между этими соединениями приводит к количественным изменениям состава элементов вторичной структуры белка S100A1, уменьшая процент альфа-спиральных элементов и увеличивая количество неупорядоченных элементов вторичной структуры. Показано, что, кроме влияния на структуру S100A1, 2'-5'-триаденилаты несуттєво изменяют константу диссоциации ионов Ca^{2+} и белка S100A1. Были идентифицированы аминокислотные остатки, которые непосредственно задействованы во связывании 2'-5'-триаденилата с белком S100A1. Принимая во внимание описанное ранее свойство триаденилатов стимулировать мышечное сокращение *in vivo*, было сделано предположение

относительно возможного механизма этого феномена, суть которого заключается в непосредственном взаимодействии 2'-5'-триаденилатов с белком S100A1, структурные и функциональные изменения в составе которого опосредованно влияют на дальнейшее взаимодействие S100A1 с рианодиновым рецептором.

Ключевые слова: 2'-5'-триаденилати, S100A1, структурные изменения.

SUMMARY

Skorobogatov O. Yu. A study on mechanisms of interaction between 2'-5'-triadenylates with the S100A1 protein.

A dissertation work is submitted to acquire the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, specialty 03.00.03 – molecular biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to a study on mechanisms of interaction of dephosphorylated 2'-5'-triadenylates with a human calcium-binding protein S100A1 *in vitro*. For the first time, it was shown that upon binding, a protein secondary structure is changing, i.e. a proportion of alpha-helical elements decreases and the percentage of disordered elements increases. It was demonstrated that besides the secondary structure alterations, 2'-5'-triadenylates changed (not significantly, though) the S100A1-Ca²⁺ binding constant. We have determined the amino acid residues which are directly involved in the 2'-5'-triadenylate-S100A1 interaction. Considering the earlier described ability of 2'-5'-triadenylate to stimulate the muscular contraction *in vivo*, we may suggest, that 2'-5'-triadenylate interacts with S100A1 directly, causing structural and functional alterations within the S100A1, and, therefore, influencing of S100A1 interaction with a ryanodine receptor.

The possibility of complex formation between 2'-5'-A₃/2'-5'-A₃-epo and S100A1 was studied as well. Using the circular dichroism spectroscopy, we showed that a CD spectrum of S100A1 is altered upon interaction with 2'-5'-A₃/2'-5'-A₃-epo. Noteworthy, complex formation was shown in both, presence and absence of Ca²⁺ ions.

It was shown that 2'-5'-A₃/2'-5'-A₃-epo binding causes changes in the secondary structure of protein. The complex formation initiates a decrease of alpha-helical content for 6% and 5% of the apo-S100A1, respectively. Contrary to the apo-form, the alpha-helical content of the protein holo-form was decreased less significantly – for 3% and 4%, respectively. We managed to identify the increase of disordered secondary structure elements for both, apo- and holo-S100A1, what allowed us to suggest, that a proportion of alpha-helices transform into disordered elements upon 2'-5'-A₃ or 2'-5'-A₃-epo binding.

Further, we used Fourier infrared spectroscopy, which allowed to identify the Amide I and II bands shifts. The values of the shifts equaled 1cm⁻¹ and 3 cm⁻¹, which allows us to assume that the percentage of disordered secondary structure elements increased.

We identified also the amino-acid residues within the S100A1 protein, that demonstrated the highest CSP values upon binding to 2'-5'-A₃. They turned out to be located within the Ca²⁺-binding loops, which constitute a central part of EF-hands. The bulk of the signals originated from the N-terminal region of the Ca²⁺-binding domain, where His18, Lys21, Asp24, Lis25 and Lis30, were localized. These amino-acid residues are known to be strongly depended on the experimental conditions, such as temperature and pH.

Other amino-acid residues, Val69 and Gln72, which are located within the C-terminal domain of S100A1, showed significantly lower CSP values upon binding to 2'-5'-A₃.

Considering the low solvent accessibility of the aforementioned amino-acid residues, we assume that 2'-5'-A₃ does not have a possibility to bind those residues directly. It is more likely that 2'-5'-A₃ binds S100A1 elsewhere, probably, in Ca²⁺-binding domain and/or linker region; the conformational changes, caused by the binding, are transmitted to the sensitive monomer interface.

We identified existence of 3 bonds within the 5 Å radius, using computer modeling. One of those, a hydrogen bond, is formed between the NH₂- group and the adenine I and AMP and CO group of Ala80. The second and third bonds are electrostatic. They are formed between the PO₂- group of the II AMP residue and the CO group of Val69 and between the PO₂- group of the III AMP residue and CO group of Asn64. Computer modeling of the binding between 2'-5'-A₃ and S100A1 supports the NMR data, obtained earlier – the PO₂- group of the second AMP and the CO group of Val69 interact electrostatically; this might explain the significant CSP value of Val69. The latter is a part of C-terminal domain of S100A1.

We demonstrated the insignificant impact of 2'-5'-A₃ on the Ca²⁺-affinity of S100A1. Interestingly, 2'-5'-A₃ caused the decrease of Ca²⁺-affinity to S100A1 by $0.2 \cdot 10^{-4}$, while the epoxy modified analogue caused the increase of the binding constant by $0.8 \cdot 10^{-3}$, compared to the control experiment.

We also found that 2'-5'-oligoadenylates influence significantly the protein kinase activity. Of note, they could act either as activators or inhibitors, depending on the nature of a 2'-5'-oligoadenylate. This effect depended also on the concentration of both, the 2'-5'-oligoadenylate and ATP. One of the protein kinases, Aurora, was shown to be inhibited by 2'-5'-A₃ i 2'-5'-A₃-epo by 35% and 40%, respectively.

Keywords: 2'-5'-triadenylates, S100A1, structural alterations.