



УДК 577.113.6

© 2011

З. Ю. Ткачук, О. В. Козлов, І. Я. Дубей, А. П. Кухаренко

2'-5'-Олігоаденілати та їх аналоги як модулятори активності протеїнкіназ

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Д. М. Говорунгом)

Показано, що 2'-5'А₃ та його аналоги виявляють різноманітну, як інгібуючу, так і стимулюючу, дію на активність протеїнкіназ. У більшості випадків епоксиданалог 2'-5'ероА₃ має вищу стимулюючу активність порівняно з природним 2'-5'А₃. Найвищу інгібуючу активність виявляє аналог 2'-5' aminoА₃, що містить залишок 8-аміноаденозину. Криві титрування протеїнкінази Аюгога препаратами 2'-5'А₃ та 2'-5'ероА₃ не залежать лінійно від концентрації олігоаденілатів і мають V- або W-подібний характер. Більш виражений ефект інгібування протеїнкінази Аюгога виявляє аналог 2'-5'ероА₃, активність якого залишається високою в ширшому діапазоні концентрацій. Інгібуюча активність 2'-5'А₃ та 2'-5'ероА₃ залежить від концентрації АТФ. Припускається можливий механізм біологічної дії олігоаденілатів, згідно з яким 2'-5'А₃ та його аналоги, зв'язуючись з протеїнкіназами, змінюють їх конформацію, що спричиняє зміну ферментативної активності. На користь цього припущення свідчить характер впливу препаратів на протеїнкінази, коли відбувається не тільки інгібування, а й підвищення активності ферментів.

Відомо, що трифосфати 2'-5'-триаденілатів (ppp2'-5'А₃) є активаторами РНКазы L. Вони утворюють безпосередній комплекс з РНКазою L і таким чином запускають противірусний захист клітини, індукований інтерфероном. Зв'язування ppp2'-5'А₃ з ферментом є обов'язковою умовою для індукції рибонуклеазної активності [1]. Для зв'язування з РНКазою L на 5'-кінці 2'-5'-олігонуклеотиду необхідна наявність однієї фосфатної групи, а для активації ферменту — як мінімум двох фосфатних груп [2]. На сьогодні відомо три активних ділянки РНКазы L. Перша ділянка відповідає за безпосереднє зв'язування з ppp2'-5'А₃, друга має нуклеазну активність і третя за своєю структурою схожа на протеїнкіназу [3].

При відсутності ppp2'-5'А₃ інгібіторний домен в анкерній послідовності ферменту разом з його "протеїнкіназною" ділянкою інгібують рибонуклеазний домен. Взаємодія ppp2'-5'А₃ із сайтом зв'язування РНКазы L сприяє зміні структури ферменту так, що утворюється димерна форма, в результаті чого рибонуклеазний домен набуває здатності до розщеплення вірусної РНК.

Проте, як свідчать дані наукових джерел, крім $ppp2'-5'A_3$ індукцію РНКазы L здатні викликати й інші хімічні сполуки, які, таким чином, можуть бути активаторами противірусного захисту. Природа таких сполук відрізняється від $ppp2'-5'A_3$, і разом з тим вони є стимуляторами імунної системи [4]. Методом комп'ютерного моделювання були побудовані моделі зв'язування ряду низькомолекулярних синтетичних олігонуклеотидів з РНКазою L, а також моделі розщеплення нею вірусної РНК. Було встановлено, що дефосфорильовані, так звані корові $2'-5'$ -триаденілати ($2'-5'A_3$) не можуть зв'язуватися з РНКазою L та індукувати розщеплення вірусної РНК. Однак їх роль у метаболізмі клітини до цього часу повністю не з'ясована.

У ряді робіт було показано, що поза РНКазою L існують й інші білки, з якими можуть утворювати комплекси $5'$ -фосфорильовані $2'-5'$ -олігоаденілати. У роботі [5] було встановлено, що $ppp2'-5'$ -олігоаденілати впливають на активність топоізомерази I, причому інгібуєчий ефект залежить від довжини олігомеру та від наявності фосфатних груп. Найбільш значну інгібуючу активність виявляють фосфорильовані $2'-5'$ -олігоаденілати, молекули яких містять близько 10 залишків аденозину. Також показано, що вірусна зворотна транскриптаза інгібується фосфорильованими $2'-5'$ -олігоаденілатами, причому можливе утворення комплексу останніх з ферментом [6].

Відомо, що протеїнкінази (ПК) є ключовими медіаторами різних клітинних реакцій [7, 8] (табл. 1). При багатьох захворюваннях, у тому числі при онкологічних патологіях і гіпертонії, спостерігається дерегуляція протеїнкіназної активності. У свою чергу, багато інгібіторів ПК виявляють протипухлинну активність. Раніше нами було показано, що дефосфорильовані тримери $2'-5'A_3$ та їхні аналоги мають специфічну біологічну дію, впливаючи на потенціалзалежні кальцієві канали, активність яких пов'язана з ПК A [9]. Виявлено також вплив "корових" $2'-5'$ -олігоаденілатів та їх аналогів на скорочення гладеньких м'язів аорти і стегнової артерії щура. Дію "корових" $2'-5'$ -олігоаденілатів та їх аналогів можна усунути, використовуючи блокатори кальцієзалежних калієвих каналів високої провідності або блокатори ПК A [10]. Нами також було показано можливість утворення комплексів дефосфорильованих $2'-5'$ -триаденілатів з деякими білками [11] та ймовірність впливу цих сполук на структуру ПК [12].

На підставі цих даних нами висловлено припущення про можливий механізм дії "корових" $2'-5'$ -олігоаденілатів, який передбачає їх безпосереднє зв'язування з регуляторними білками клітини, у результаті чого істотно змінюється конформація таких білків, що може призводити до значного модулювання їх активності, як у позитивний, так і в негативний

Таблиця 1. Досліджувані протеїнкінази та їх характеристики

Протеїнкіназа	Біологічні ефекти
CK2	Посилення активності пов'язують із запальними реакціями і диференціюванням клітин, а також пухлинним ростом [7]
FGFR-1	Регуляція ангиогенезу і проліферація клітин [8]
TIE2	Ангиогенез, міжклітинні взаємодії, активність ендотеліальних клітин, онкологія [9]
ROCK	Активують міозин. Їх вміст диференційно змінюється в процесі розвитку серця, при патологічній гіпертрофії міокарда і дилатаційній кардіоміопатії [10]
JNK1	Прискорене старіння, диференціювання, апоптоз [11]
Aurora	Проліферація, регуляція мітозу [12]
ASK1	Апоптоз, клітинний поділ [13]

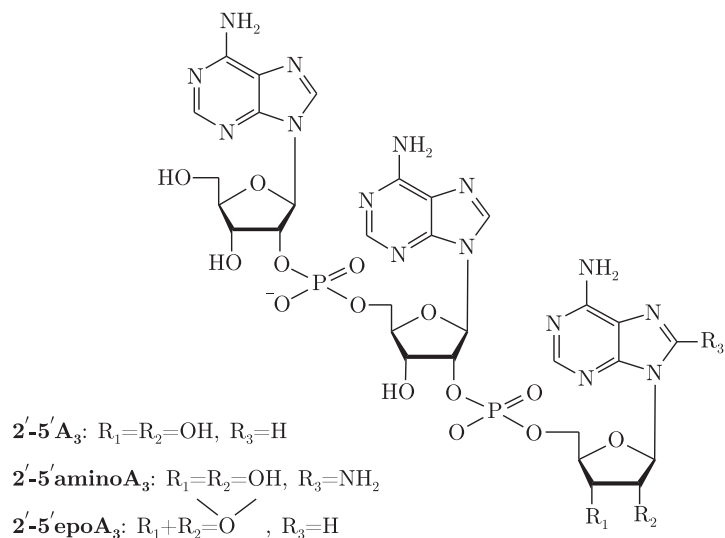


Рис. 1. Структури 2'-5'-триаденілату та його аналогів

бік. Проте до сьогодні були відсутні докази такого впливу олігоаденілатів на регуляторні білки. Нам вдалося знайти прямі докази здатності “корових” 2'-5'-триаденілатів та їх аналогів модулювати активність ПК.

Матеріали і методи. У роботі використовували ПК СК2 та пептидний субстрат ПК RRREEETEEE (СК-tide) виробництва фірми “New England Biolabs” (США), усі інші ПК — фірми “Upstate/Millipore” (США).

Природний 2'-5'-триаденілат ($2'-5'A_3$) та два його аналоги — 2'-5'-епокситриаденілат ($2'-5' \text{ epo}A_3$) і 2'-5'-аміотриаденілат ($2'-5' \text{ amino}A_3$) — синтезували модифікованим фосфотриєфірним методом у розчині [13]. Структури цих сполук наведено на рис. 1.

Вивчення активності ПК у присутності олігоаденілатів проводили в тест-системі *in vitro* методом прямого визначення продукту протеїнкіназної активності з використанням [^{32}P]-АТФ [8]. Реакційна суміш містила 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 2 мкг пептидного субстрату RRREEETEEE і 10 од. відповідної ПК (табл. 2). Загальний об'єм реакційної суміші становив 30 мкл, концентрація АТФ — 50 мкМ. У реакційну суміш вносили по 1 мкл розчину 2'-5'-олігоаденілату потрібної концентрації. Після інкубації протягом 20 хв при 30°C в реакційну суміш додавали 1 мкКі міченого АТФ. Реакцію зупиняли додаванням 10 мкл 5% фосфорної кислоти. Реакційні суміші наносили на фосфоцелюлозні фільтри (діаметр 20 мм). Фільтри тричі промивали 1% розчином фосфорної кислоти й висушували при 50 °С. Радіоактивність визначали на сцинтиляційному лічильни-

Таблиця 2. Вплив $2'-5'A_3$ та його аналогів на активність протеїнкіназ*

Препарат	Активність протеїнкіназ, % відносно контролю**						
	СК2	FGFR	TIE2	ROCK1	JNK1	Aurora	ASK
$2'-5'A_3$	184	125	118	140	131	65	122
$2'-5' \text{ epo}A_3$	196	134	76	160	172	60	145
$2'-5' \text{ amino}A_3$	88	—	110	—	—	35	79

*Концентрація олігоаденілатів 66 мкМ, АТФ — 50 мкМ.

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

ку TriCarb-7000 (“Perkin-Elmer”, США). Як негативну пробу використовували інкубаційний буфер. Ступінь активності ПК визначали за співвідношенням рівнів радіоактивності продуктів реакції в присутності 2'-5'-олігоаденілатів та без них.

Для титрування ПК Auroга використовували препарати 2'-5'А₃ та 2'-5'ероА₃ у концентраціях від 5 до 160 мкМ при концентрації АТФ 25 та 100 мкМ. Будували графіки залежності активності ПК (тобто радіоактивності проби в імпульсах за хвилину, СРМ) від lg C олігоаденілатів, за якими визначали величини IC₅₀ останніх. Усі наведені дані щодо протеїнкіназної активності отримано в результаті трьох незалежних вимірювань, стандартна похибка не перевищує 5%.

Обговорення результатів. Для дослідження впливу 2'-5'-олігоаденілатів різної будови на активність ряду ПК використовували 2'-5'А₃ та його аналоги, в яких 3'-кінцевим нуклеозидом виступав епоксиаденозин та 8-аміноаденозин, тобто аденозин, модифікований відповідно по вуглеводному фрагменту чи по гетероциклічній основі (див. рис. 1). Вивчали вплив цих препаратів на активність кіназ FGFR, TIE2, ROCK1, Auroга, JNK1, CK2 та ASK у модельній тест-системі [8], в якій визначали кількість продукту ферментативної реакції. Пряме визначення ґрунтувалося на фосфорилуванні ферментами короткого пептидного субстрату RRREEETEEE за участю радіоактивно міченого АТФ.

На першому етапі дослідження вивчали вплив олігоаденілатів на всі ПК при концентрації препаратів 66 мкМ. Як видно з отриманих результатів (див. табл. 2), різні ПК по-різному реагують на досліджувані сполуки. У більшості випадків препарати стимулюють активність ПК, проте спостерігається й пригнічення. Як видно з табл. 2, природний “коровий” 2'-5'А₃ в основному активує кінази, особливо сильно (на 84%) зростає активність ПК CK2. Помірно активуються ферменти JNK1 і ROCK1 (відповідно на 31 і 40%). У межах 18–25% активуються ПК TIE2, ASK і FGFR. Навпаки, щодо ПК Auroга природний 2'-5'А₃ виявляє протилежний ефект (35% інгібування).

Аналогічну, однак більш виражену дію має аналог 2'-5'ероА₃. Його стимулююча активність вища, ніж у немодифікованого 2'-5'А₃. Епоксианалог у порівнянні з природним триаденілатом більше стимулює активність ПК: рівень активації ним CK2 і FGFR на 9–12%, ROCK1 і ASK на 20–23%, а JNK1 на 41% вищий, ніж нормальним 2'-5'А₃. На відміну від 2'-5'А₃, який дещо стимулює активність TIE2, епоксианалог інгібує цю ПК (на 24%) і на 5% сильніше порівняно з нормальним тримером пригнічує кіназу Auroга (40% інгібування проти 35%).

Яскраво виражену інгібуючу дію щодо ПК Auroга (трикратне зниження активності останньої) виявляє аміноаналог 2'-5'aminoА₃. Він також помітно інгібує кінази ASK (на 21%) і CK2 (на 12%). Необхідно підкреслити, що природний “коровий” тример і особливо його епоксианалог мають виражений стимулюючий ефект на ферменти ASK і особливо CK2, аміноаналог же інгібує їх. Однак 2'-5'А₃ має незначний стимулюючий ефект щодо ПК TIE2, подібно до 2'-5'aminoА₃, на відміну від інгібуючої дії 2'-5'ероА₃.

Таким чином, 2'-5'А₃ і його аналоги в описаних умовах проявляють як інгібуючу, так і стимулюючу активність ПК дію. Особливо варто відзначити майже двократне зростання активності CK2 під впливом 2'-5'А₃ та 2'-5'ероА₃ та трикратне пригнічення ПК Auroга аміноаналогом. У більшості випадків 2'-5'ероА₃ дає сильніший стимулюючий ефект порівняно з немодифікованим 2'-5'А₃. Найбільш виражена ж інгібуюча дія характерна для 2'-5'aminoА₃, що містить залишок 8-аміноаденозину.

ПК Auroга — єдиний з ферментів, який інгібувався всіма олігоаденілатами в концентрації 66 мкМ. На наступному етапі досліджень ми визначили залежність її активності від

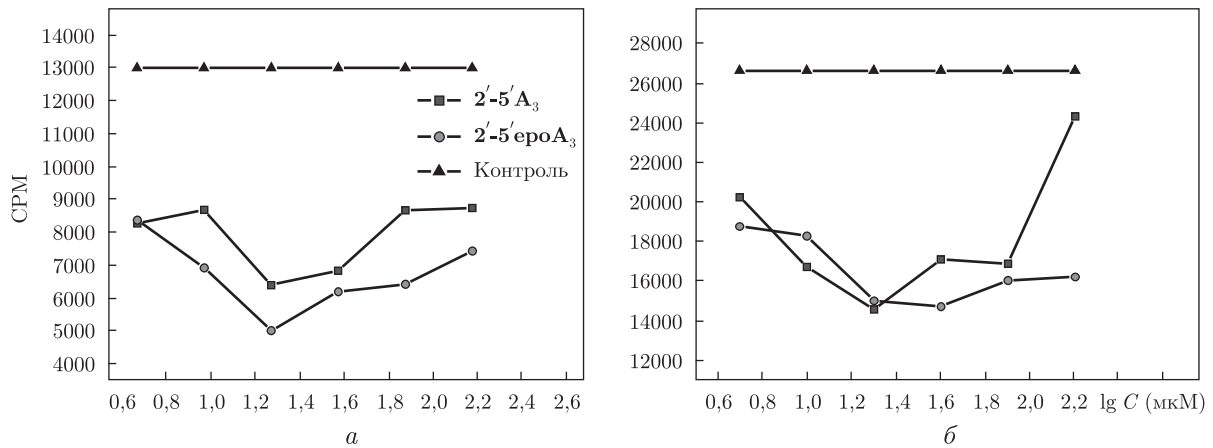


Рис. 2. Залежність активності протеїнкінази Аигога від концентрації $2'-5'A_3$ і $2'-5'epoA_3$. По осі ординат подано активність протеїнкінази в імпульсах міченого АТФ на 1 мкг пептидного субстрату (СРМ); по осі абсцис — концентрації препаратів 5, 10, 20, 40, 80 і 160 мкМ (подані в логарифмічній шкалі $\lg C$), АТФ — 100 мкМ (а) та 25 мкМ (б). Контроль — реакція без додавання препарату. Довірчі інтервали не вказано (див. експериментальну частину)

концентрації препаратів. Для цього ферментативні реакції проводили в присутності $2'-5'A_3$ і його епоксиданалога в різних концентраціях (від 5 до 160 мкМ) при двох концентраціях АТФ — 25 і 100 мкМ. Було побудовано графіки залежності активності ПК від логарифма концентрації препаратів (взятої в мкМ). Виявилось, що при обох концентраціях АТФ отримані криві не мають лінійної залежності активності від $\lg C$.

При концентрації АТФ 100 мкМ криві для обох препаратів мають V-подібний характер (рис. 2, а). При титруванні Аигога “коровим” $2'-5'A_3$ в межах концентрацій $\lg C$ 0,7–1,0 її активність дещо зростає, а потім різко знижується при збільшенні концентрації до $\lg C$ 1,3 і далі підвищується із зростанням концентрації до $\lg C$ 1,9. Аналогічну, проте більш виражену картину інгібуючої дії в цих умовах демонструє аналог $2'-5'epoA_3$. При зростанні його концентрації від $\lg C$ 0,7 до $\lg C$ 1,3 інгібуючий ефект зростає, а потім поступово зменшується при подальшому збільшенні концентрації.

При зменшенні концентрації АТФ до 25 мкМ активність ПК Аигога в контрольних експериментах зростає приблизно вдвічі, інгібуюча ж активність препаратів у цих умовах знижується (див. рис. 2, б). Крива титрування ферменту “коровим” $2'-5'A_3$ носить W-подібний характер зі зниженням активності в зоні від $\lg C$ 0,7 до $\lg C$ 1,3, далі спостерігається нелінійне зростання з локальним максимумом при $\lg C$ 1,6, а починаючи з $\lg C$ 1,9 підвищення концентрації препарату закінчується різким падінням інгібуючого ефекту й майже повним відновленням базової активності ферменту при $\lg C$ 2,2.

У випадку епоксиданалога крива має інший характер, подібний до того, що спостерігався при концентрації АТФ 100 мкМ. Діапазон інгібуювання значно ширший, ніж у немодифікованого тримеру, а максимальний ефект спостерігається при $\lg C$ 1,6 (для немодифікованого триаденілату — при $\lg C$ 1,3). Таким чином, інгібуювання ПК Аигога аналогом $2'-5'epoA_3$ за характером помітно відрізняється від дії нормального $2'-5'A_3$: воно глибше і залишається на високому рівні в ширшому діапазоні концентрацій.

Загальним для всіх досліджених випадків є те, що існує певна оптимальна інгібуюча концентрація препарату в області середніх значень $\lg C$, а при її зменшенні, так і зростанні відбувається більш чи менш виражене зниження інгібуючої активності. Крім того, при

зниженні концентрації АТФ в реакційній суміші інгібуюча дія олігоаденілатів на фермент послаблюється.

З побудованих кривих титрування (див. рис. 2, а) 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 терапевтичного засобу дозволяє використовувати меншу діючу концентрацію і знизити ризик розвитку побічних ефектів. Було встановлено, що величина IC_{50} у зоні низьких концентрацій для природного $2'-5'A_3$ становить 19,3 мкМ, а для епоксипохідної $2'-5'epoA_3$ — 11,6 мкМ у присутності 100 мкМ АТФ. Таким чином, епоксианалог $2'-5'epoA_3$ 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 $2'-5'epoA_3$ цей показник становить відповідно 23,8 та ~85 мкМ.

При концентрації АТФ 25 мкМ жоден з препаратів не зміг досягнути 50%-го інгібування ПК Аурога у дослідженому діапазоні концентрацій (див. рис. 2, б).

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, “корові” олігоаденілати можуть модулювати активність регуляторних білків-протеїнкіназ і таким чином впливати на багато клітинних процесів, включаючись у систему сигнальних шляхів клітини.

Розглянемо деякі можливі механізми описаних вище ефектів. Існує велика кількість ПК, але спільним для всіх є наявність сайту зв'язування з АТФ, сайту зв'язування з білком, який фосфорилується тією чи іншою ПК, та сайту перенесення фосфату від ПК на білок, що фосфорилується. Якщо ліганд ефективно зв'язується з яким-небудь із цих сайтів, відбувається інгібування фосфорилування. Відомо, що аналоги аденіну й аденозину взаємодіють із сайтом зв'язування АТФ і можуть бути потенційними інгібіторами ПК. Можна було б припустити, що олігоаденілати теж діють за подібним механізмом. Низькомолекулярні сполуки, що конкурують з АТФ за АТФ-зв'язуючий сайт, запобігають фосфорилуванню клітинних білків і тим самим блокують передачу клітинного сигналу. Відомі інгібітори ПК найчастіше взаємодіють саме із сайтом зв'язування АТФ.

Крім безпосереднього зв'язування лігандів з основними активними сайтами, можливий і інший механізм, за допомогою якого ліганди, в даному випадку похідні $2'-5'A_3$, впливають на ПК. За цим механізмом, дещо подібним до алостеричного регулювання активності, взаємодія може відбуватися поза функціонально активними сайтами ПК таким чином, що відбувається зміна конформації білка, що, у свою чергу, призводить до зміни активності ферменту. На користь цього припущення свідчать отримані нами результати щодо впливу препаратів на активність ПК: під дією олігоаденілатів відбувається не тільки інгібування, а й підвищення активності ферментів. У випадку ж зв'язування препаратів з активним сайтом ПК (наприклад, АТФ-зв'язуючим) активність ферменту повинна пригнічуватись. Тому ймовірно, що $2'-5'A_3$ та його аналоги модулюють активність ПК саме за рахунок впливу на їх конформацію.

1. Castelli J. C., Hassel B. A., Wood K. A. et al. A study of the interferon antiviral mechanism: apoptosis activation by the 2-5A system // J. Exp. Med. – 1997. – **186**, No 6. – P. 967–972.
2. Thaku C. S., Jha B. K., Dong B. et al. Small-molecule activators of RNase L with broad-spectrum antiviral activity // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 2007. – **104**, No 23. – P. 9585–9590.

3. Dong B., Silverman R. H. Alternative function of a protein kinase homology domain in 2',5'-oligoadenylate dependent RNase L // Nucl. Acids Res. – 1999. – **27**, No 2. – P. 439–445.
4. Toninaga A., Saito S., Kohno S. Antiviral effects of 2,5-oligoadenylates (2-5As), and related compounds // Microbiol. Immunol. – 1990. – **34**, No 9. – P. 737–747.
5. Malathi K., Paranjape J. M., Ganapathi R., Silverman R. H. HPC1/RNASEL mediates apoptosis of pro-state cancer cells treated with 2',5'-oligoadenylates, topoisomerase I inhibitors, and Tumor Necrosis Factor-related apoptosis-inducing ligand // Cancer Res. – 2004. – **64**, No 24. – P. 9144–9151.
6. Liu D. K., Owens G. F. Inhibition of viral reverse transcriptase by 2-5-oligoadenylates // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1987. – **145**, No 1. – P. 291–297.
7. Wang D., Jang D.-J. Protein kinase CK2 regulates cytoskeletal reorganization during ionizing radiation-induced senescence of human mesenchymal stem cells // Cancer Res. – 2009. – **69**, No 20. – P. 8200–8207.
8. Грищенко А. А., Бджола В. Г., Кухаренко О. П., Ярмолюк С. М. Пошук інгібіторів протеїнкінази FGFR1 серед похідних хромону // Ukr. Bioorg. Acta. – 2009. – № 1. – P. 50–56.
9. Kostyuk P. G., Kozlov A. V., Tkachuk Z. Yu. et al. Effect of “core” 2',5'-oligoadenylates on the phosphorylation-dependent calcium channels in GH3 cells // Укр. біохім. журн. – 1995. – **67**, No 1. – С. 26–32.
10. Філіппов І. Б., Ткачук З. Ю., Дубей І. Я. Дослідження механізмів регуляції судинного тонуусу 2'-5'-олигаденілатами // Доп. НАН України. – 2010. – № 6. – С. 152–157.
11. Yashchuk V. M., Kudrya V. Yu., Levchenko S. M., Tkachuk Z. Yu. et al. The optical response of the polynucleotides-proteins interaction // Mol. Cryst. Liq. Cryst. – 2011. – **535**. – P. 93–110.
12. Козлов А. В., Китам В. О., Ткачук З. Ю. Молекулярная модель взаимодействия 2'-5'-олигаденілатов протеинкиназой С // Доп. НАН України. – 2009. – № 3. – С. 171–175.
13. Дубей І. Я., Дубей Л. В. Синтез (2'-5')-триаденілатів та їх аналогів з використанням О-нуклеофільного каталізу реакції міжнуклеотидної конденсації // Biopolymers and Cell. – 2007. – **23**, № 6. – С. 538–544.

Інститут молекулярної біології
і генетики НАН України, Київ

Надійшло до редакції 17.11.2010

Z. Yu. Tkachuk, A. V. Kozlov, I. Ya. Dubey, A. P. Kukharenko

2'-5'-Oligoadenylates and their analogs as modulators of the activity of protein kinases

2'-5' A₃ and its analogs are found to have diverse, inhibiting as well as stimulating, effects on the activity of protein kinases. In most cases, 2'-5' ероA₃ analog showed a more pronounced stimulating activity as compared to that of the natural 2'-5' A₃. The highest inhibiting activity is demonstrated by 2'-5' aminoA₃ analog containing the residue of 8-aminoadenosine. The curves of titration of Aurora protein kinase with 2'-5' A₃ and 2'-5' ероA₃ show no linear dependence on the oligoadenylate concentration and are V- or W-like shapes. 2'-5' ероA₃ analog demonstrated a more pronounced inhibition effect on Aurora characterized by the high activity in a broader range of concentrations. The inhibitory effect of 2'-5' A₃ and 2'-5' ероA₃ depends on the ATP concentration. A possible mechanism of biological action of oligoadenylates is suggested, where the binding of 2'-5' A₃ and its analogs to protein kinases results in conformational changes which lead to a modification of the enzymatic activity. This suggestion is supported by the character of action of the tested compounds on protein kinases, since not only inhibition but also stimulation of enzymes occurs.