

З. Ю. Ткачук, С. М. Левченко, А. В. Ребрів, Л. В. Ткачук

Вивчення взаємодії між олігоаденілатами та інтерфероном методом мас-спектрометрії

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

Встановлено, що 2',5'-олігоаденілат та його епоксиданалог 2',5'-ероАз здатні приєднуватися до α -інтерферону в кількості від 1 до 5 молекул. Подібні властивості по відношенню до α -інтерферону мають 3',5'-олігоаденілати з різною кількістю аденілатів. В той же час інсулін, за винятком 3',5'-А₅, не має такої здатності. Ці дані дають можливість розглядати α -інтерферон як один із цільових білків для "корових" олігоаденілатів, які беруть участь у механізмі противірусного захисту клітини.

Вивчення механізму противірусного захисту організму все більше наближає нас до розуміння функціонування цієї системи, завдяки чому стає можливим створення нових противірусних препаратів. Відомо, що основними активаторами противірусної системи є одноланцюгові трифосфати 2',5'-олігоаденілатів, які контролюють систему інтерферону, через активацію рибонуклеази L. Дуже мало відомостей, про механізм дії інших олігоаденілатів, які в достатніх кількостях є в клітині. Це, насамперед, "корові" 2',5'-триолігоаденілати, які вивільнюються після активації рибонуклеази L, а також 2',5'-олігоаденілати з більшою кількістю аденозинів. Наприклад, встановлено, що п'ятичленні 2',5'-олігоаденілати можуть контролювати активність топоізомераз [1]. Зовсім немає даних про механізм дії 3',5'-олігонуклеотидів, які також здатні впливати на систему противірусного захисту.

Зараз відомо про три цільові білки, які є важливими для функціонування механізму противірусного захисту. Це насамперед ендорибонуклеаза L, яка розщеплює односпіральні вірусні РНК [2], протейніназа R, яка контролює синтез вірусних білків [3], та білок МХ, який відповідає за особливу дію проти вірусу грипу [4]. Однак головна роль у противірусному захисті клітини належить інтерферонам, які не тільки індують експресію генів, включених у противірусну дію клітини, але, як показали досліді Сільвермана, можуть активуватись олігорибонуклеотидами, продуктами розщеплення ендорибонуклеази L [5]. Ці односпіральні олігорибонуклеотиди, зв'язуючись з RIG-I, стимулюють його АТФазну активність, що приводить до сигналізації гена ІФН- β , продукт якого, у свою чергу, індуює активність 2',5'-олігоаденілатсинтетази та синтез трифосфатів 2',5'-олігоаденілатів. Отже, односпіральні кінцеві продукти гідролізу вірусних РНК можуть викликати активацію синтезу інтерферону. У той же час виникає запитання, чи можуть "корові" 2',5'-олігоаденілати та 3',5'-олігоаденілати зв'язуватись безпосередньо з інтерфероном і таким чином впливати на його функції.

Дослідження здатності різних олігоаденілатів зв'язуватись з інтерфероном може дати додаткову інформацію про головні білкові мішені, які задіяні в противірусному механізмі захисту клітин. На основі отриманих даних можна провести моніторинг нових противірусних препаратів. Тому ми ставили за мету вивчити здатність олігоаденілатів та їх аналогів нековалентно взаємодіяти з деякими білками, в першу чергу рекомбінантним α -інтерфероном.

© З. Ю. Ткачук, С. М. Левченко, А. В. Ребрів, Л. В. Ткачук, 2013

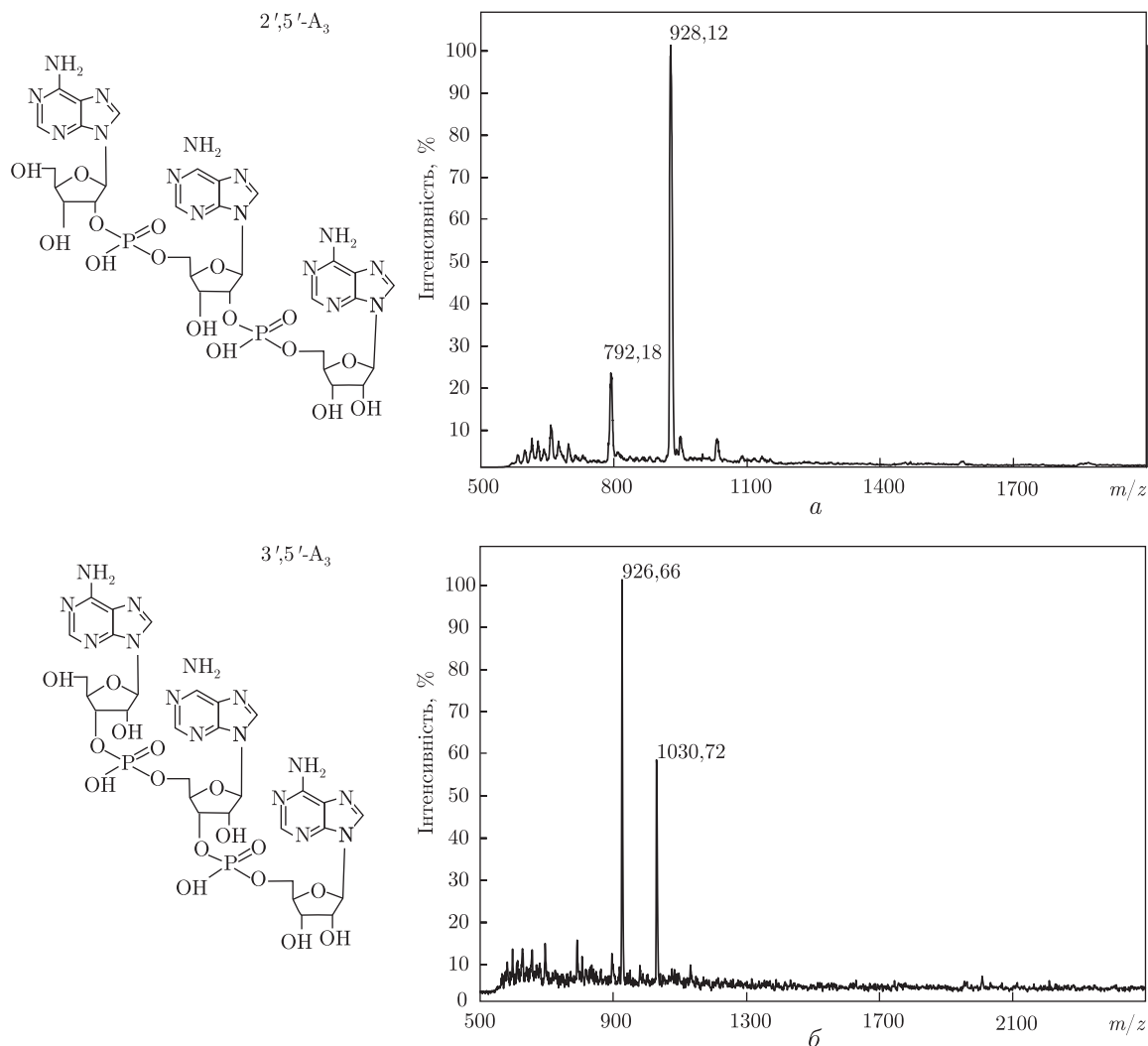


Рис. 1. Структурні формули та мас-спектри досліджуваних олігонуклеотидів

Матеріали та методи. У досліджах використовували 2',5'-олігоаденілат (2',5'-A₃) та його епоксианалог (2',5'-epoA₃), які синтезували як описано раніше [6] (рис. 1), тричленний (3',5'-A₃) та п'ятичленний (3',5'-A₅) 3',5'-олігоаденілати, синтезовані твердофазним фосфітамідним методом на синтезаторі нуклеїнових кислот ASM-800 Biosset (Росія), α -інтерферон людини ("Інтерфармбіотек", Україна), інсулін ("Фармак", Україна). Застосовували водні розчини препаратів. Інкубацію водних розчинів олігоаденілатів та протеїнів проводили при температурі 37 °С протягом 10 хв. Концентрація речовин в монорозчинах та сумішах становила: $C_{2',5'-A_3} = 10^{-4}$ М, $C_{3',5'-A_3} = 10^{-4}$ М, $C_{3',5'-A_5} = 0,6 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{2',5'-epoA_3} = 10^{-4}$ М, $C_{ІФН} = 10^{-5}$ М, $C_{інсулін} = 3,5 \cdot 10^{-5}$ М.

Мас-спектрометричний аналіз проводили на MALDI-TOF спектрометрі Voyager DE PRO ("Applied Biosystems", США). Застосовували H⁺-матричну іонізацію поліпептидів та олігонуклеотидів за допомогою синапінової кислоти ("Sigma-Aldrich") під дією лазерного опромінення. Молекулярну масу визначали шляхом віднімання від значення m/z однозарядженого іона одиниці (молекулярна маса H⁺ становить 1,007 Да). Концентрація синапі-

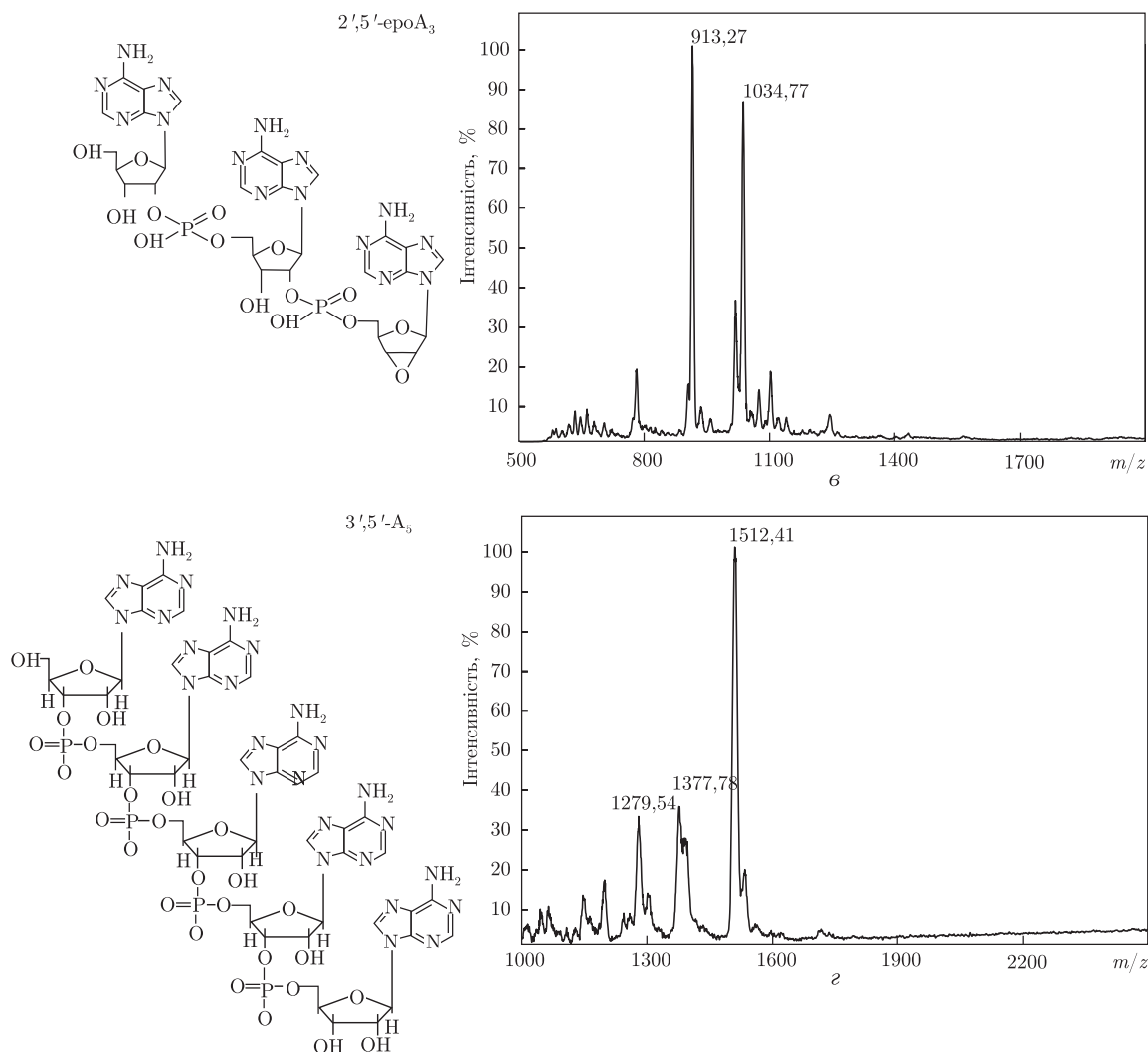


Рис. 1. Продовження

нової кислоти у матричному реагенті становила 10 мг/мл, реактив розчиняли у розчині, що складався з однакових об'ємів ацетонітрилу ("Sigma-Aldrich") та 0,1% водного розчину трифтороцтової кислоти ("Sigma-Aldrich"). Співвідношення матричного реагенту до досліджуваного зразка — 1 : 1 (об'єм), кількість суміші, що використовувалась для одного нанесення, — 1,5–2 мкл. Застосовували лінійний режим роботи часопрольотного детектора мас-спектрометра, прикладена напруга становила 25 кВ. Паспортна точність вимірювання мас — 0,05%. Діапазон мас, що визначаються приладом, — 500–300000 Да. Максимальна величина відгуку мас-спектрометра — 65000 (в пропріоритарних одиницях фірми-виробника). Коливання значення маси для однієї речовини на різних спектрах пояснюється зміною роздільної здатності приладу залежно від обраних параметрів під час запису спектрів та не повною відтворюваністю геометрії піків. Зменшення роздільної здатності призводить до розширення піків, внаслідок чого збільшується різниця між розрахованою масою та експериментальною.

Отримані спектри обробляли програмою Data Explorer 4.0 ("Applied Biosystems").

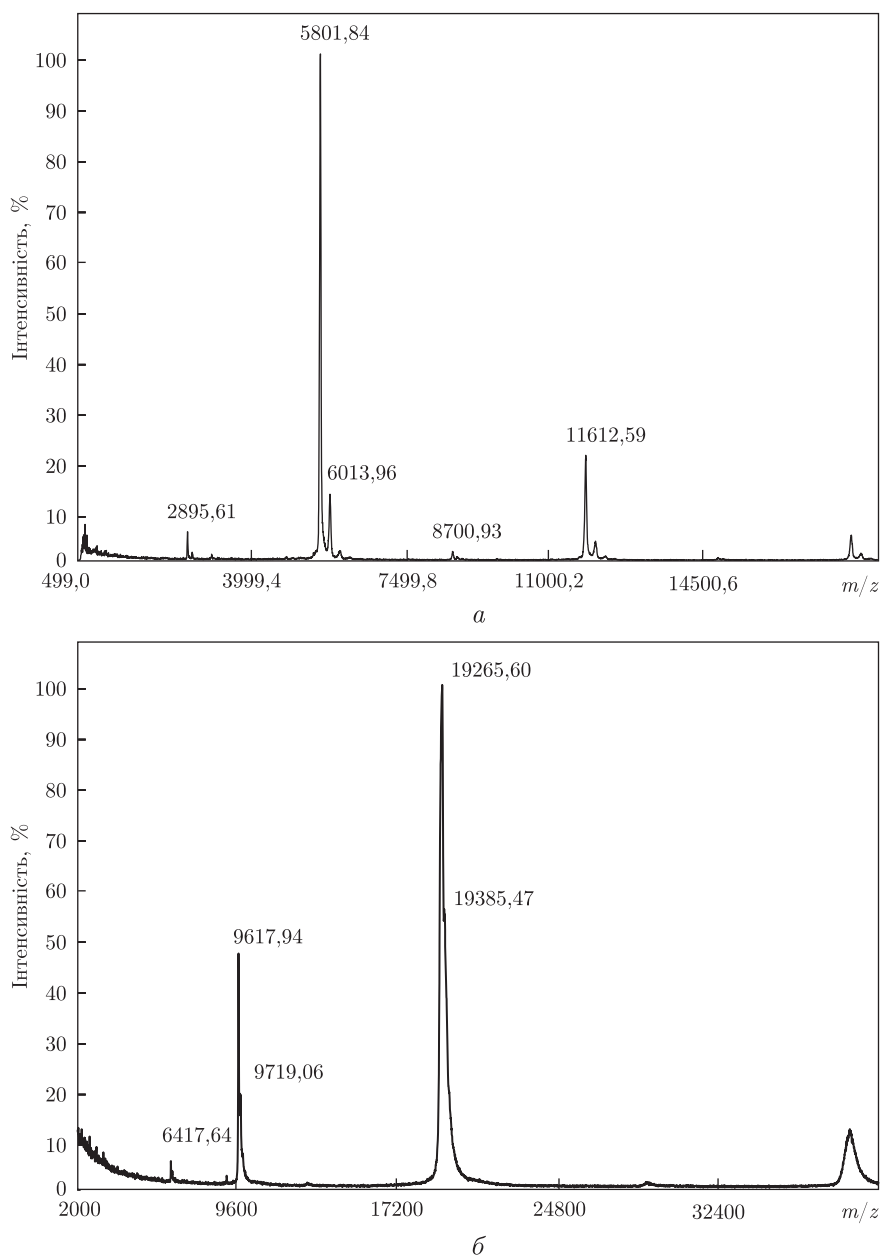


Рис. 2. MALDI мас-спектри білків інсуліну (а), α -інтерферону (б) та їх сумішей з олігоаденілатом 2',5'-A₃ (в, г відповідно)

Результати та їх обговорення. На першому етапі досліджували взаємодію 2',5'-A₃ з низькомолекулярним білком — інсуліном, який достатньо вивчений. Було отримано спектри 2',5'-A₃ (див. рис. 1, а), препаративного інсуліну (рис. 2, а) та їх суміші (див. рис. 2, в). Експериментальні значення отриманої маси для інсуліну та 2',5'-A₃ становлять 5800,8 та 927,1 Да відповідно. Природу речовини, що відповідає піку $m/z = 792,2$ на мас-спектрі 2',5'-A₃ (див. рис. 1, а), ми не вивчали. Поява даного піка може бути спричинена деградацією 2',5'-A₃. Значення маси, отримане для інсуліну, узгоджується з даними інших дослідників [7].

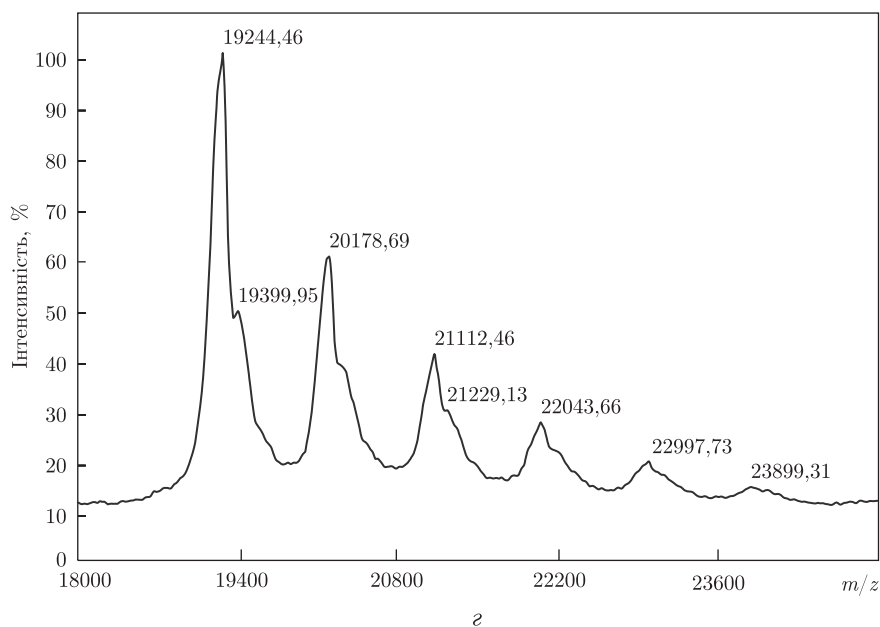
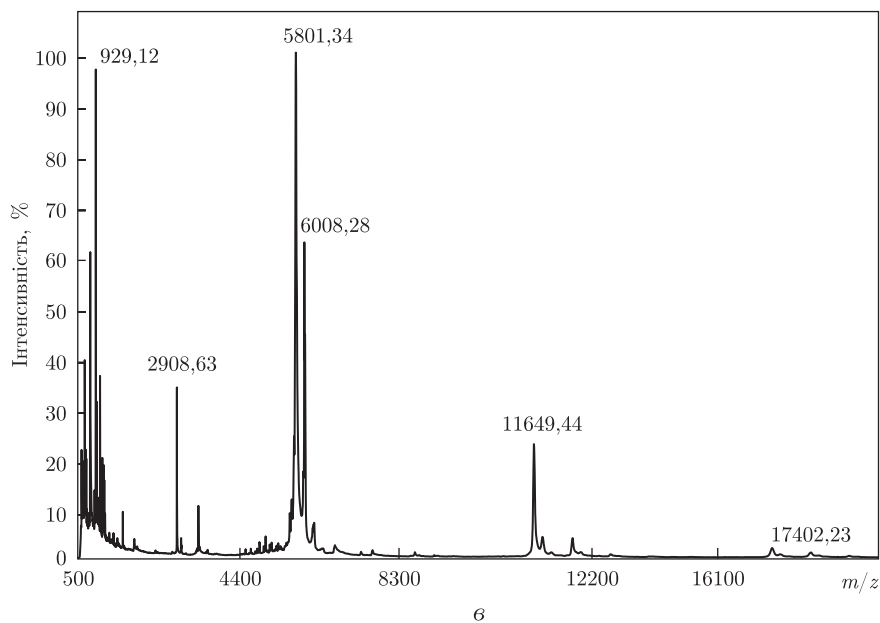


Рис. 2. Продовження

Піки m/z зі значеннями 11613 та 17411 відповідають однозарядним комплексам з двох та трьох молекул інсуліну відповідно (до двох чи трьох молекул приєднується іон водню H^+), пік зі значенням 2895 — двозарядній молекулі інсуліну (одна молекула білка з двома іонами водню). Пік $m/z = 6014$ — домішка в препараті, найімовірніше це попередник інсуліну, що містить зайві амінокислотні залишки.

На рис. 2, б подано мас-спектр суміші інсуліну з $2',5'$ - A_3 . У спектрі присутні окремі піки m/z зі значеннями 929,1, 2908,6, 5801,3, 11649 та 17402, що відповідають вільним компонентам суміші ($2',5'$ - A_3 та інсулін). Отже, взаємодія інсуліну з $2',5'$ - A_3 нами не зафіксована.

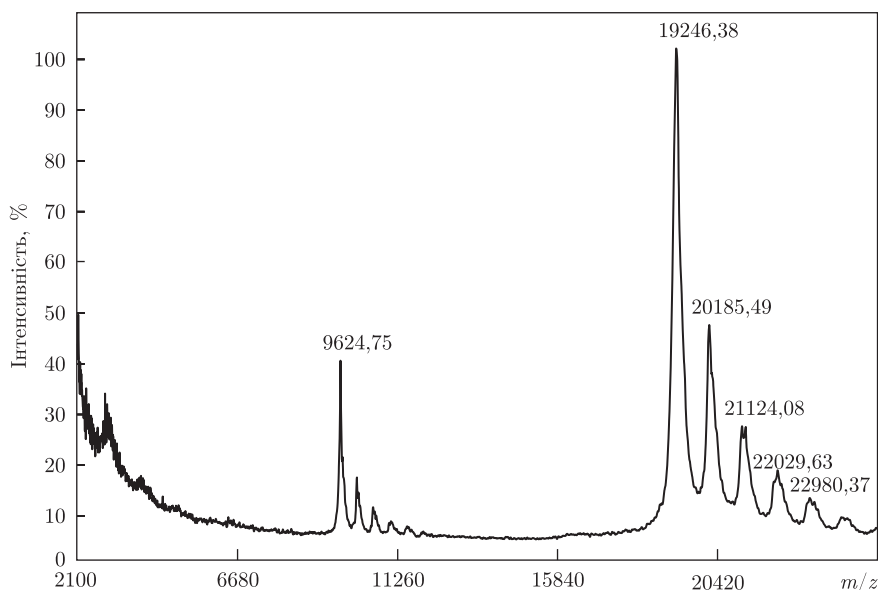


Рис. 3. MALDI мас-спектр суміші α -інтерферону та олігоаденілату 3',5'-A₃

У наступній серії експериментів використовували інший білок — інтерферон, який широко застосовується в медицині для лікування вірусних захворювань. На рис. 2, б показано спектр препарату інтерферону, на якому пік зі значенням $m/z = 19265$ відповідає однозарядному іону. Піки m/z зі значеннями 9618 та 6417 відповідають дво- та тризарядним іонам інтерферону (значення маси до заряду в 2 та 3 рази менше однозарядного), пік зі значенням 38610 — комплексу з двох молекул інтерферону та одного H^+ .

На рис. 2, г зображено частину спектра суміші інтерферону та 2',5'-A₃, яка відображає утворення комплексу інтерферону з однією або декількома молекулами 2',5'-A₃ (зафіксована взаємодія від 1 до 5 молекул). На відміну від суміші інсулін-2',5'-A₃, мас-спектр якої складається лише з піків, що належать складовим компонентам розчину, додавання до інтерферону 2',5'-A₃ призвело до значних змін в мас-спектрі. Зокрема, в мас-спектрі системи інтерферон-2',5'-A₃ з'являються піки m/z зі значеннями 20179, 21112, 22044, 22998 та 23899. На нашу думку, вони відповідають комплексу з молекули інтерферону, від 1 до 5 молекул 2',5'-A₃ та H^+ . Приклад розрахунку теоретичної маси утвореного комплексу з однієї молекули інтерферону, однієї молекули 2',5'-A₃ та H^+ : $(19244-1)+(929-1)+1 = 20172 \approx 20179$. Оскільки даний комплекс зафіксовано після впливу лазерного випромінення під час іонізації, то його фіксація на мас-спектрах свідчить про досить сильну взаємодію молекул білка та 2',5'-A₃. Слід зауважити, що комплексу білка з двома або декількома молекулами олігонуклеотиду важче утворитися, ніж з однією, та легше розпастися ще на етапі іонізації лазером (до реєстрації його приладом). Тому таке множинне утворення комплексів свідчить про міцну взаємодію інтерферону з досліджуваним олігонуклеотидом.

Надалі ми вивчали взаємодію інтерферону з іншим олігоаденілатом природного походження — 3',5'-A₃, який відрізняється від попереднього внутрішньомолекулярними зв'язками. На рис. 1, б поданий його спектр, маса становить 925,7 Да. Речовина (або комплекс) з піком $m/z = 1030,7$ не береться до уваги, оскільки при дослідженні 3',5'-A₃ з використанням іншої матриці (СНСА — α -ціано-4-гідроксикорична кислота) даний пік зникає, тоді основний пік 926,7 Да залишається незмінним.

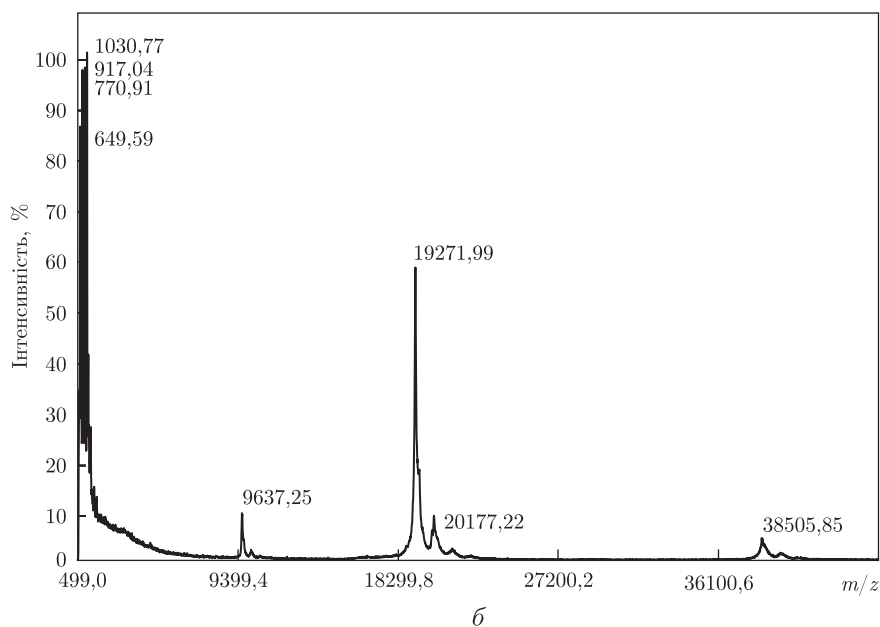
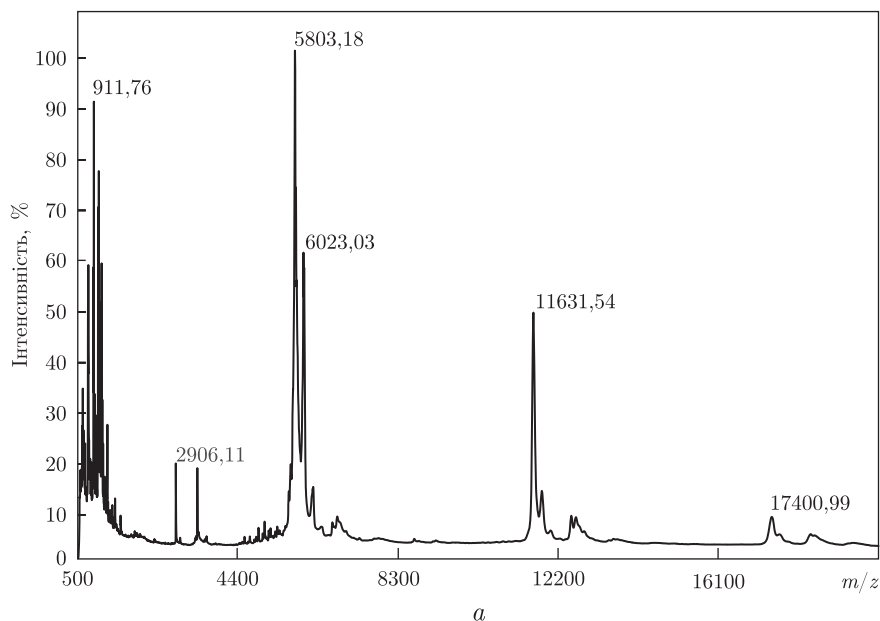


Рис. 4. MALDI мас-спектр суміші інсуліну, α -інтерферону з 2',5'-ероА₃ (а, б) та 3',5'-А₅ (в, г відповідно)

На рис. 3 поданий спектр суміші інтерферону з 3',5'-А₃, на якому показана множинна взаємодія молекули білка з однією або декількома молекулами олігоаденілату (до 5 мінімум).

Наступним об'єктом для дослідження було обрано 2',5'-ероА₃ — модифікований аналог 2',5'-олігоаденілату. Як показали попередні дослідження, навіть незначна зміна в структурі 2',5'-А₃ призводить до радикальної зміни його біологічної активності [8, 9].

Згідно з отриманими даними, молекулярна маса 2',5'-ероА₃ становить 912,3 Да (див. рис. 1, в). Спектр, що належить суміші інсуліну з 2',5'-ероА₃ складається з окремих піків, які належать 2',5'-А₃ та власне білку (рис. 4, а). Поява додаткових піків не спостерігається

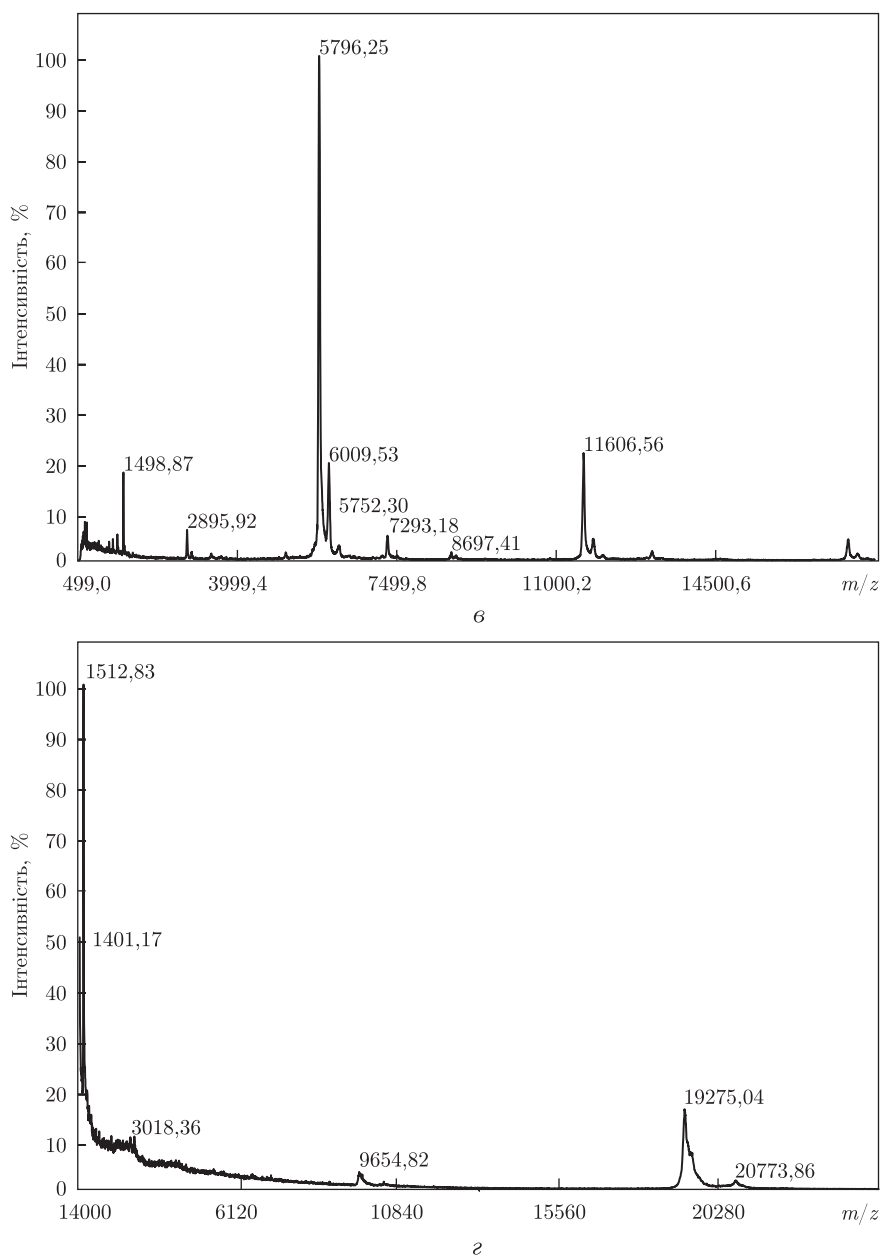


Рис. 4. Продовження

ся. Отже, як і у випадку тримеру $2',5'$ - A_3 , взаємодія даного типу молекул з інсуліном не зафіксована.

Порівняння мас-спектрів суміші інтерферону та $2',5'$ -еро A_3 (див. рис. 4, б) та мас-спектрів окремих компонентів суміші показало появу піка $m/z = 20177$, який, на нашу думку, свідчить про можливість взаємодії білка інтерферону з однією молекулою $2',5'$ -еро A_3 . При масштабуванні спектра стають помітними ще два піки, які відповідають комплексам з однієї молекули інтерферону та відповідно двох і трьох молекул $2',5'$ -еро A_3 .

Також в роботі досліджувалася наявність взаємодії інтерферону з $3',5'$ - A_5 , який містить в своєму складі 5 ланок аденозину. Визначена нами молекулярна маса такого олігомеру

становить 1512 Да (див. рис. 1, з). Решта піків належать речовинам, які є продуктами розпаду 3',5'-А₅ в результаті відщеплення певних ланок та руйнування фосфатних зв'язків [10]. Дані, отримані нами для α-інтерферону, узгоджуються з даними інших дослідників [11].

На відміну від спектрів сумішей інсуліну з 2',5'-А₃ та 2',5'-ероА₃, спектр інсуліну з доданим 3',5'-А₅ не є сукупністю окремих піків, що належать білку та олігоаденілату (див. рис. 4, в). У спектрі з'являється пік $m/z = 7293$, який належить комплексу з однієї молекули білка, Н⁺ та однієї молекули 3',5'-А₅, що свідчить про здатність інсуліну зв'язуватися принаймі з однією молекулою досліджуваного олігоаденілату.

Додавання до 3',5'-А₅ α-інтерферону, як і у випадку інших олігонуклеотидів, призвело до появи в мас-спектрі додаткового піка, а саме зі значенням $m/z = 20774$, який належить комплексу з молекули інтерферону, Н⁺ та однієї молекули 3',5'-А₅ (див. рис. 4, з).

Як вже зазначалося, загальноприйнято протівірусні властивості 2',5'-олігоаденілатів пов'язувати з їх здатністю активувати індуковану інтерфероном рибонуклеазу, яка, в свою чергу, руйнує вірусну мРНК [2], проте дослідження показали що 2',5'-олігоаденілатам та їх аналогам притаманні лікувальні властивості, які не пояснюються вищевказаним механізмом. Зокрема, до таких властивостей належать запобігання відторгненню тканин після трансплантації, кардіопротекторна дія та ін. [12, 13]. З огляду на останнє стає зрозумілою необхідність пошуку нових механізмів, здатних пояснити біологічні властивості олігоаденілатів та їх аналогів. Одним з можливих пояснень може бути присутність в клітині цільових білків, взаємодія з якими й призводить до активації механізмів, які забезпечують лікувальні властивості олігоаденілатів. В попередніх роботах методом флуоресцентної спектроскопії було показано наявність зв'язування 2',5'-олігоаденілатів та їх модифікованих похідних з білками альбуміном, імуноглобуліном та інтерфероном [14]. У свою чергу, проведений аналіз олігоаденілатів, білків та систем олігоаденілат-білок за допомогою мас-спектрометрії дав можливість встановити наявність між ними взаємодій нековалентного типу та дослідити деякі її особливості.

Таким чином, у даній роботі показано, що природний 3',5'-А₃, 2',5'-А₃ та його модифікований аналог 2',5'-ероА₃ з інсуліном не зв'язуються. Ситуація змінюється у випадку 3',5'-А₅, який, на відміну від тричленних олігоаденілатів, виявляє здатність зв'язуватися з інсуліном. До інтерферону всі досліджувані олігоаденілати залежно від їх довжини та внутрішньомолекулярної будови здатні приєднуватися в кількості від 1 до 5 молекул.

1. Schröder H. C., Kelve M., Schäcke H. et al. Inhibition of DNA topoisomerase I activity by 2',5'-oligoadenylates and mismatched double-stranded RNA in uninfected and HIV – 1-infected H9 cells // Chem. Biol. Interact. – 1994. – **90**, No 2. – P. 169–183.
2. Clemens M. J., Vaquero C. M. Inhibitor of protein synthesis by double-stranded RNA in reticulocyte lysates: evidence for activation of an endoribonuclease // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1978. – **83**. – P. 59–68.
3. Meurers E., Chong K., Galabru J. et al. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA – activated protein kinase induced by interferon // Cell. – 1990. – **62**. – P. 379–390.
4. Pavlovich J., Staeheli P. The antiviral potentials of Mx proteins // J. Interferon Res. – 1991. – **11**. – P. 215–219.
5. Malathi K., Saito T., Crochet N. et al. RNase L releases a small RNA from HCV RNA that refolds into a potent PAMP // RNA. – 2010. – **16**, No 11. – P. 2108–2119.
6. Ткачук З. Ю., Яковенко Т. Г., Семернікова Л. І. та ін. Вплив 2'-5' олігоаденілатів та їх аналогів на проліферацію стовбурових клітин кісткового мозку мишей *in vitro* та *in vivo* // Biopolymers and Cell. – 2007. – **23**, № 1. – С. 14–20.
7. Salih B. Determination of high molecular weight biomolecules and their non-covalent complexes in MALDI-TOF-MS // Proceedings Book, 4th AACD Congress. – 2004. – P. 352–354.

8. Ткачук З. Ю., Дубей І. Я., Яковенко Т. Г. та ін. Синтез 2'-5'-олігоаденілатів та їхній вплив на проліферацію і міграцію стовбурових клітин кісткового мозку мишей *in vitro* та *in vivo* // *Biopolymers and Cell*. – 2007. – **23**, № 1. – С. 14–20.
9. Філіппов І. Б., Ткачук З. Ю., Дубей І. Я. Механізми регуляції судинного тонусу 2'-5'-олігоаденілатами // *Доп. НАН України*. – 2010. – № 6. – С. 152–157.
10. Hettich R., Buchanan M. Structural Characterization of Normal and Modified Oligonucleotides by Matrix-assisted Laser Desorption Fourier Transform Mass Spectrometry // *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* – 1991. – **2**. – Р. 402–412.
11. Guo-Hua Z., Guo-An L., Guo-Qing S. et al. Study on the quality of recombinant proteins using matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry // *J. Gastroenterology*. – 1999. – **5**, No 3. – Р. 235–240.
12. Tkachuk Z., Kvasnyuk E., Matsuka G., Mikhaïlopulo I. (2'-5') Oligoadenylate analogues useful as inhibitors of host-vs-graft response // Patent US 5571799. – Publ. 05.11.96.
13. Сидорик Л. Л., Дубей І. Я., Бобык В. І. та др. Терапевтичні ефекти дії різних доз 2'-5'-олігоаденілата при експериментальному міозиніндукованому пошкодженні міокарда // *Доп. НАН України*. – 2001. – № 9. – С. 161–165.
14. Ткачук З. Ю., Дубей Л. В., Лосицький М. Ю. та ін. Вивчення взаємодії 2'-5'-олігоаденілатів та їх аналогів із протеїнами за допомогою флуоресцентної спектроскопії // *Укр. біохім. журн.* – 2011. – **83**, № 1. – С. 45–53.

*Інститут молекулярної біології
і генетики НАН України, Київ
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 21.08.2012

З. Ю. Ткачук, С. Н. Левченко, А. В. Ребриєв, Л. В. Ткачук

Исследование взаимодействия между олигоаденилатами и интерфероном методом масс-спектрометрии

Показано, что 2',5'-олигоаденилат и его эпоксианалог 2',5'-epoA₃ способны присоединяться к α-интерферону в количестве от 1 до 5 молекул. Подобными свойствами по отношению к α-интерферону обладают 2',5'-олигоаденилаты с разным количеством аденилатов. В то же время инсулин, за исключением 2',5'-A₅, не обладает такой способностью. Полученные данные позволяют рассматривать α-интерферон как один из целевых белков для “коровых” олигоаденилатов, участвующих в механизме противовирусной защиты клетки.

Z. Yu. Tkachuk, S. M. Levchenko, A. V. Rebriyev, L. V. Tkachuk

Studying the interaction between oligoadenylates and interferon by mass-spectrometry

It is shown that 2',5'-oligoadenylate and its epoxy analogue 2',5'-epoA₃ can bind to α-interferon in an amount from 1 to 5 molecules. 2',5'-oligoadenylates that contain a different number of adenylates have similar properties. At the same time, only 2',5'-A₅ shows the ability to bind to insulin. These data give the opportunity to consider α-interferon as one of the target proteins for “core” oligoadenylates that participate in the mechanism of antiviral defense of cells.