

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук
Кафедра біології

Кваліфікаційна робота
освітній ступінь – бакалавр

на тему «**АГРЕГАЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ НАНОКОМПОЗИТНОГО
КОМПЛЕКСУ ПРОТИПУХЛИННОГО ЦИТОКІНА Р43**»

Виконала: студентка 4-го року навчання
спеціальність 091 — біологія
Масич Марина Дмитрівна

Керівники:
Корнелюк О.І.,
член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор

Мартиненко В.С.,
кандидат біологічних наук,
старший викладач кафедри біології
НаУКМА

Рецензент

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пасічник Т.В.
«__» червня 2020 року

Київ – 2020

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ_____	4
ВСТУП_____	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ_____	7
1.1. Загальна характеристика білків p43 та ЕМАР II_____	7
1.1.1. Структура та експресія гена, що кодує білок p43_____	7
1.1.2. Перетворення білка p43 в ЕМАР II_____	8
1.1.3. Структура та функціональні домени білків p43 та ЕМАР II_____	9
1.1.4. Біологічна активність білків p43 та ЕМАР II_____	12
1.2. Використання цитокінів p43та ЕМАР II: проблема агрегації та її подолання шляхом створення нанокмпозитних комплексів_____	17
1.2.1. Агрегація білкових препаратів _____	17
1.2.2. Характеристика декстрану 70 як ліганда при створенні нанокмпозитних комплексів_____	19
1.2.3. Використання білків p43 та ЕМАР II: підвищення стабільності_	21
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ_____	24
2. 1. Характеристика об'єкту дослідження_____	24
2.2. Реактиви, матеріали та обладнання_____	24
2.2.1. Реактиви_____	24

2.2.2. Розчини _____	24
2.2.3. Обладнання _____	25
2.3. Отримання рекомбінантного білка p43 _____	25
2.4. Визначення агрегаційних властивостей нанокompозитного комплексу білка p43 та декстрану методом динамічного розсіяння світла _____	27
2.5. Біоінформатичний аналіз вторинної структури білка p43 _____	28
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ__	29
3.1. Отримання рекомбінантного білку p43 _____	29
3.2. Дослідження агрегації білка p43 у складі нанокompозитного комплексу за допомогою динамічного розсіювання світла _____	30
3.3. Біоінформатичний аналіз вторинної структури білка p43 _____	34
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ _____	38
ВИСНОВКИ _____	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ _____	41

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

AIMP1 - аміноацил-тРНК-синтетаза взаємодіючий мультифункціональний білок 1 (aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multi-functional protein 1, AIMP1)

ARS - аміноацил-тРНК-синтетаза (aminoacyl-tRNA synthetase, ARS)

DLS - динамічне розсіювання світла (dynamic light scattering, DLS)

EMAP II - ендотеліальний моноцитаактивуючий поліпептид II (endothelial monocyte-activating polypeptide II, EMAP II)

PBS – натрій-фосфатний буфер (phosphate buffered saline, PBS)

SDS-PAGE – гель-електрофорез в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрія (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

TNF – фактор некрозу пухлин (tumor necrosis factor, TNF)

ВСТУП

Розвиток генно-інженерних методів обумовив стрімке зростання використання рекомбінантних протеїнів у різних сферах, в тому числі медицині. Використання білкових терапевтичних засобів є частиною лікувальної стратегії багатьох захворювань [1].

Білок p43 або AIMP1 - це компонент високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК-синтетаз вищих еукаріот. Він функціонує не тільки як частина ферментного комплексу, але й має свої власні функції [2]. Крім того, p43 є попередником ендотеліального моноцитактивуючого поліпептиду II (ЕМАР II) – цитокіну, що володіє широким спектром біологічної активності, при цьому вартим уваги є його протипухлинна активність за рахунок антиангіогенної дії [2, 3].

Оскільки p43 та ЕМАР II мають білкову природу, то їм притаманна здатність до агрегації, наслідком чого можуть бути зміни у просторовій структурі і, відповідно, біологічної активності. Для вирішення цієї проблеми стосовно речовин білкової природи використовують ряд засобів, який включає модифікацію структури протеїну або модифікацію середовища. При цьому важливо забезпечити не тільки збереження необхідних функцій білку, але й пересвідчитись у відсутності будь-якого токсичного впливу на організм [1, 4]. Таким чином, пошук різних шляхів забезпечення агрегаційної стабільності є важливим для можливості використання конкретної сполуки у якості терапевтичного засобу, а також структурно-функціональних фундаментальних досліджень.

Проблему агрегації p43 та ЕМАР II в інституті молекулярної біології і генетики НАН України було запропоновано вирішити шляхом створення нанокомпозитних комплексів білку з використанням у якості ліганду декстрану 70 [5]. Ця речовина повністю біосумісна і при цьому може стабілізувати структуру білків для запобігання утворення агрегатів.

З огляду на вищевикладене, метою роботи було дослідження впливу декстрана 70 у складі нанокompatитного комплексу на агрегаційний потенціал білку р43.

Відповідно до мети необхідно було вирішити такі завдання:

- 1) отримати рекомбінантний білок р43 за допомогою бактеріальних систем експресії;
- 2) дослідити агрегаційні властивості нанокompatитного комплексу р43 з декстраном 70 методом динамічного розсіяння світла;
- 3) провести біоінформатичний аналіз вторинної структури білка р43.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика білків p43 та ЕМАР II

Аміноацил-тРНК-синтетази (ARS) – це ферменти, що відповідають за з'єднання амінокислот з відповідними тРНК під час трансляції білків. В організмах вищих еукаріот більшість цих ферментів існує у вигляді високомолекулярного комплексу до складу якого входять з допоміжні некаталітичні протеїни - p43, p38 та p18. Головною функцією цих білків є забезпечення стабільності комплексу [6].

Білок p43 або AIMP1 або pro ЕМАР є попередником цитокіну ЕМАР II, що було встановлено Janet Kao та ін. на основі нуклеотидної послідовності [3]. В свою чергу, ендотеліальний моноцитаактивуючий поліпептид II (ЕМАР II) – це цитокін, що вперше був виділений у 1992 році Janet Kao та ін. як білок розміром 22 кДа з фібросаркоми мишей за допомогою іонообмінної хроматографії та SDS-PAGE. Під час первинного аналізу було визначено, що протеїн може індукувати коагуляцію ендотеліальних клітин через вплив на тканинний фактор, впливати на міграцію моноцитів, а також бути хемоатрактантом для гранулоцитів. Завдяки здатності до активації епітеліальних клітин та моноцитів білок отримав назву ЕМАР II, хоча і не виявляв гомології до раніше виділеного білка ЕМАР I розміром 40 кДа [7].

1.1.1. Структура та експресія гена, що кодує білок p43. Ген білку p43 і відповідно ЕМАР II, експресується майже в усіх клітинах організму людини [2].

Дослідження Ulrike E. Knies та ін. показали, що експресія гену p43 *in vitro* відбувається в усіх клітинах, а данні *in vivo* демонструють, що експресія є локальною – в місцях наявності апоптичних клітин, а саме ділянках ремоделювання тканин [8]. Після синтезу більша частина білка p43

залишається в цитозолі як частина комплексу аміноацил-тРНК-синтетаз, хоча невелика частина виявлена в ядрі [6].

Нуклеотидна послідовність, що кодує р43 в організмі людини знаходиться на довгому плечі 4 хромосоми в положенні 24 (4q24) і представлена ділянкою ДНК розміром 31,2 тис. по. В своєму складі ген р43 містить 7 екзонів (рис. 1.1), при цьому стартовий кодон знаходиться в 2 екзоні. В результаті 1 етапу біосинтезу білку, а саме транскрипції утворюється транскрипт мРНК з 1057 по, серед яких 118 по не транслюються далі [2].

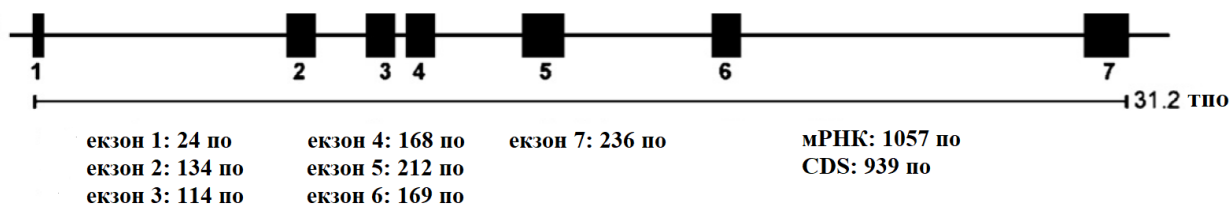


Рис. 1.1. Схематична будова гена, що кодує р43 [2].

1.1.2. Перетворення білка р43 в ЕМАР II. Перехід р43 в ЕМАР II відбувається в результаті протеолізу у відповідь на клітинний стрес, а саме апоптоз, гіпоксію та наявність хіміотерапевтичних агентів. При цьому місцем розщеплення є залишок аспартату 144 у складі ASTD мотиву та залишок 14 для р43 організму людини [2].

Існує декілька гіпотез стосовно протеолітичного агента, що розщеплює proEMAP. Оскільки ЕМАР II відщеплюється від proEMAP за умов апоптозу клітини, а каспази активуються і розщеплюють різні протеїни (полі(АДФ-рибоза)-полімераза (poly(ADP-ribose) polymerase, PARP), протеїнкіназа C) по залишкам аспартату, то Heike A. Behrendorf та ін. висунули гіпотезу, що протеолітичним агентом є саме каспази. Вони провели експериментальне дослідження під час якого проінкубували отриманий *in vitro* proEMAP з рекомбінантними каспазами і провели електрофоретичне розділення в SDS-PAGE, а також вестерн блот аналіз. Результати показали, що каспази, а саме

каспази 3 та 7 дійсно беруть участь в розщепленні p43, при цьому каспаза 7 є більш активною [9].

Через 2 роки F. R. Zhang та ін. отримали протилежні результати. Вчені проінкубували рекомбінантний proEMAP з активованими каспазою 3 та 9, а далі провели електрофоретичне розділення в SDS-PAGE з фарбування блакитним Кумасі, але зрілої форми білку не було отримано. Таким чином, F. R. Zhang та ін. показали, що proEMAP не розщеплюється ані за умов *in vitro* чи *in vivo* і висунули припущення, що позитивний результат експериментів Heike A. Behrendorf та ін. може бути наслідком використання не чистого білку, а лізату клітин, а також використання неповної каталітичної форми ферменту [10].

Отже, детальний механізм розщеплення p43 до EMAP II, а саме умови та протеолітичний агент, досі залишається не вивченим і потребує дослідження.

1.1.3. Структура та функціональні домени білків p43 та EMAP II.

Повна просторова структура білка p43 невідома, оскільки білок є нестабільним, проте існують комп'ютерні моделі (рис. 1.2).

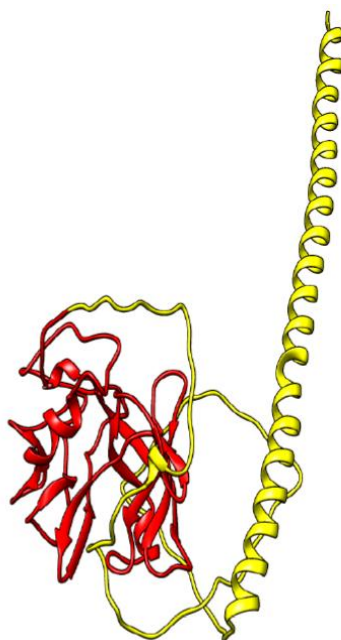


Рис. 1.2. Модель просторової структури p43: N-домен виділений жовтим кольором, C-домен виділений червоним кольором [11].

Відомо, що AIMP1 складається з 312 амінокислотних залишків, які формують С та N модулі, що зв'язані неструктурованою послідовністю. N-кінець поліпептиду складається з 146 амінокислот, не виявляє гомології до інших білків і відповідає за взаємодію з N-кінцем аргінін-тРНК синтетази людини. С-кінцевий домен р43 має здатність до взаємодії з різними тРНК і відповідає протеолітичній форма р43 – цитокіну ЕМАР II, структура якого досліджена більш детально [11].

Youngsoo Kima та ін. дослідили кристалічну структуру ЕМАР II і визначили, що вона представлена 2 молекулами, які взаємодіють за допомогою водневих зв'язків петлями С-кінцевого регіону, а саме залишками амінокислот 108, 133 та 136. Кожна молекула ЕМАР II складається з 11 β -шарів, що формують ядро та 3 зовнішніх (фланкових) α -спіралей (рис. 1.3).

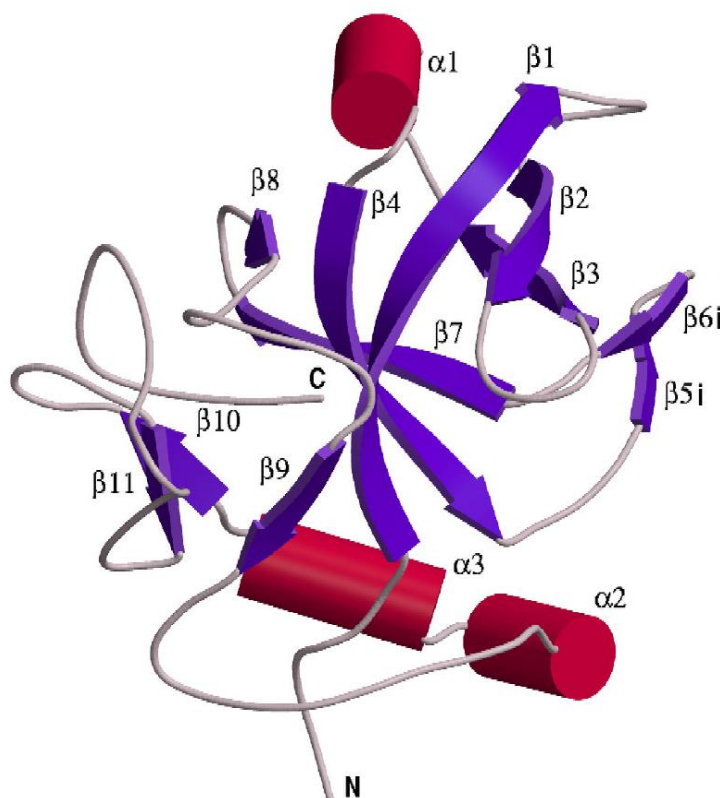


Рис.1.3. Просторова структура ЕМАР II: червоним кольором зазначені α -спіралі, синім кольором зазначені β -шари [12].

Відповідність амінокислотних залишків та структур наступна: β -шар 1 – залишки 10-21, β -шар 2 – залишки 28-34, β -шар 3 – залишки 40-46, β -шар 4 – залишки 59-66, β -шар 5 – залишки 70-77, β -шар 6 – залишки 75-77, β -шар 7 – залишки 79-85, β -шар 8 – залишки 90-92, β -шар 9 – залишки 103-106, β -шар 10 – залишки 132-134, β -шар 11 – залишки 140-142, α -спіраль a1 – залишки 53-56, α -спіраль a2 – залишки 119-123, α -спіраль 3 – залишки 124-130. До N-кінцевого регіону ЕМАР II відносяться β -шари 1-7 та α -спіраль a1, які формують ОВ – олігонуклеотид/олігосахариди зв'язуючу укладку (oligonucleotide/oligosaccharide binding fold, ОВ), яка утворюється в результаті накривання β -циліндру (β -шари 1-3, 4 та 7) α -спіраллю a1, що розташовується між β -шарами 3 та 4. С-кінцевий регіон ЕМАР II утворений β -шарами 8-11, α -спіралями 2-3, а також декількома довгими петлями. Цей домен не виявляє гомології до жодних відомих структур [12].

До складу білка-попередника р43 входять 312 амінокислотних залишків, при цьому до ЕМАР II відносяться 165 залишків (147-312) (рис. 1.4).

10	20	30	40	50
MANNDAVLKR	LEQKGAEADQ	IIEYLLKQQVS	LLKEKAILQA	TLREEKKLRV
60	70	80	90	100
ENAKLLKEIE	ELKQELIQAE	IQNGVKQIPF	PSGTPLHANS	MVSENVIQST
110	120	130	140	150
AVTTVSSGTK	EQIKGGTGDE	KKAKEKIEKK	GEKKEKKQQS	IAGSADSKPI
160	170	180	190	200
DVSRLDLRIG	CIITARKHPD	ADSLYVEEVD	VGEIAPRTVV	SGLVNHVPLE
210	220	230	240	250
QMQRNRMVILL	CNLKPAKMRG	VLSQAMVMCA	SSPEKIEILA	PPNGSVPGDR
260	270	280	290	300
ITFDAFPGER	DKELNPKKKI	WEQIQPDLHT	NDECVATYKG	VPFEVKGKGV
310				
CRAQTMSNSG	IK			

Рис. 1.4. Амінокислотна послідовність р43 та ЕМАР II (виділена сірим кольором) [13].

У складі білків було визначено декілька функціональних доменів – тРНК-зв’язуючий (151-252), домен, що відповідає за міграцію лейкоцитів, моноцитів та запалення (152-166), домени проліферації фіброblastів (6-46), апоптозу (101-114) та міграції епітеліальних клітин (114-192), а також гепарин-зв’язуючий мотив (217-219, 267-269) (рис. 1.5). Домен, що відповідає за міграцію лейкоцитів, моноцитів, а також реакцію запалення, локалізований на N-кінці ЕМАР II, ця пептидна ділянка містить RIGRIIT мотив, що також присутній в тирозил тРНК синтетазі. Домен зв’язування тРНК є найбільшим за розміром і також входить до складу зрілого протеїну як і мотиви зв’язування гепарину, що беруть участь у забезпеченні антиангіогенних властивостей ЕМАР II. До складу рго-ЕМАР входять домени проліферації фіброblastів та апоптозу ендотеліальних клітин, які не властиві ЕМАР II [2].

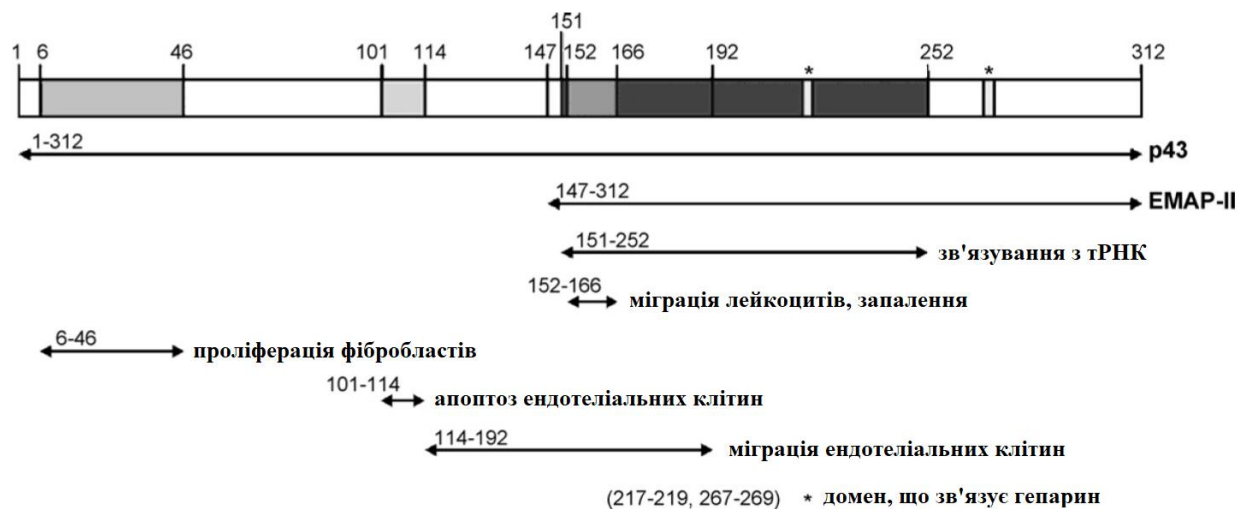


Рис.1.5. Схематична будова поліпептидного ланцюга ргоЕМАР [2].

1.1.4. Біологічна активність білків р43 та ЕМАР II. Встановлено, що р43 та ЕМАР II беруть участь у великій кількості процесів в організмі, при цьому їхні функції та місця їхньої реалізації відрізняються.

р43 функціонує в цитоплазматичному просторі - головним чином як частина комплексу ARS, а саме забезпечує його стабільність. Також AIMP1

має свої незалежні функції: як і ЕМАР II білок p43 може індукувати міграцію та апоптоз ендотеліальних клітин, функціонувати як хемоатрактант в місцях атеросклеротичного ураження. Більш цікаві його унікальні функції: p43 впливає на молекули, що беруть участь у запальних процесах (хемокіни: інтерлейкін 8, білок запалення макрофагів 1 (macrophage inflammatory protein 1, MIP-1) та MIP-2 α), моноцитарний хемотаксичний білок 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1); цитокіни: TNF- α , інтерлейкін 8; молекули адгезії: внутрішньоклітинна молекула адгезії 1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM1)), регулює продукцію макрофагами IL-8, індукує дозрівання дендритних клітин кісткового мозку, активує сигнальні шляхи MAPK (mitogen-activated protein kinase, MAPK) та транскрипційного фактору NF κ B, а також бере участь у процесах формування судин в легенях під час ембріонального розвитку, індукує проліферацію фібробластів, пов'язаний з аутоімуними захворюваннями мозку [2, 14].

ЕМАР II функціонує також у позаклітинному просторі і має такі функції: впливає на ендотеліальні клітини (коагуляцію, ріст, апоптоз), бере участь у процесах міграції лейкоцитів, а саме моноцитів, гранулоцитів та лімфоцитів як хемоатрактант, впливає на іонний склад клітини, бере участь у функціонуванні TNF як індуктор експресії відповідного гену, а також впливає на чутливість організму до терапії TNF [2].

Таким чином, можна виділити декілька головних біологічних функцій proEMAR/EMAR II: вплив на ендотеліальні клітини та антиангіогенні властивості, взаємодія з клітинами імунної системи, а також зв'язок з TNF.

Park та ін. визначили, що вплив p43 на ендотеліальні клітини залежить від кількості білку. При невеликих концентраціях p43 індукує міграцію ендотеліальних клітин, а за умов надходження білка в концентрації 10 нМ та більше спостерігалось підвищення кількості клітин з маркерами апоптозу та блокувались процеси проліферації. Слід зазначити, що протеїн AIMP1 активував MAP-кінази, а саме позаклітинну сигнал-індуковану кіназу (extracellular signal-regulated kinase, ERK) за концентрації 0,5 нМ та c-Jun

N-термінальну кіназу (с-Jun N-terminal kinase, JNK) за концентрації 10 нМ. Подальші дослідження виявили, що наявність інгібіторів ERK обумовлює інгібування міграції ендотеліальних клітин, що є підставою вважати цю кіназу провідною у процесі, а JNK була визначена відповідальною за апоптоз клітин [15].

ЕМАР II також має здатність впливати на ендотеліальні клітини. Цей білок сприяє вивільненню Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо, підвищенню вмісту антигену vWF - фактору вон Віллебранда (von Willebrand factor, vWF) та секреції Р-селектинів [16]. Дослідження Berger та ін. стосовно впливу ЕМАР II на ендотеліальні клітини на прикладі HUVEC – ендотеліальних клітинах пуповинної вени людини (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) та HMVEC - людських мікросудинних легневих ендотеліальних клітинах (human microvascular pulmonary endothelial cells, HMVEC) дали наступні результати: в залежності від дози проліферація клітин пригнічувалась до повної зупинки поділу при концентрації 250 мг/мл, а подальші експерименти підтвердили здатність ЕМАР II індукувати апоптоз ендотеліальних клітин ; також було виявлено здатність білку пригнічувати ангиогенез – під дією ЕМАР II судини формувались більш тонкими та менш розгалуженими, що також є результатом індукції апоптозу [17]. Клітини HUVEC також були об'єктом при визначенні впливу ЕМАР II на генетичну експресію в ендотелію. Було визначено, що зміна експресії спостерігається для 69 генів, які беруть участь у таких процесах: клітинний цикл (*CCNG2*), проліферація та диференціація клітин (*FOS*, *PLAB*), ДНК репарація (*UNG2*), клітинна загибель (*BIRC3*), функціонування цитоскелету (*ICAM1*), адгезія, функціонування судин (*ADM*), онкогенез (*KIT*), запалення та імунна відповідь (*CXCL1*), трансдукція сигналу (*MADH7*), регуляція транскрипції (*EGR1*, *EGR2*) та інших [18].

Оскільки ріст багатьох пухлин залежить від ангиогенезу, а ЕМАР II володіє антиангіогенною активністю за рахунок впливу на ендотеліальні клітини, цей протеїн є протипухлинним. Це обумовило подальші

дослідження та вдосконалення знань про механізми дії білку як протипухлинного. Так Tandlea та ін. з використанням HUVEC визначили, що спочатку EMAP II зв'язується з ендотеліальними клітинами через рецептор інтегрин $\alpha 5\beta 1$. Після потрапляння в клітину більша частина білку залишається в цитоплазмі (хоча невелика кількість білку була знайдена в ядрі) і взаємодіє з PSMA7 – субодиницею $\alpha 7$ протеасоми (proteasome subunit alpha 7, PSMA7) – компонентом протеасомного шляху деградації, а саме з ділянками PLACSPAAAGQSR та RLRHGGSCHV. Як відомо, PSMA7 є медіатором деградації HIF-1 α – однієї з 2 субодиниць (HIF-1 α та HIF-1 β) HIF-1 – гіпоксія-індукованого фактору 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1), який є одним із найважливіших регуляторів ангіогенезу за умов гіпоксії. До головних функцій HIF-1 α належать взаємодія та контроль проангіогенних факторів росту таких як VEGF – васкулярний ендотеліальний фактор росту (vascular endothelial growth factor, VEGF), VEGF-рецептор, еритропоетин. Було визначено, що взаємодія EMAP II та PSMA7 призводить до протеасомної деградації HIF-1 α за умов гіпоксії [19].

Важливо зазначити, що існують дані стосовно здатності саме p43 пригнічувати ріст пухлин. Yeon-Sook Lee та ін. з використанням у якості моделі фібросаркоми мишей показали, що систематичні ін'єкції p43 обумовили зменшення пухлини. При цьому використання протеїну у комбінації з лікарським препаратом проти раку – паклітакселом, було більш ефективним [20].

Вартим уваги є зв'язок p43 та EMAP II з TNF- α . Фактор некрозу пухлин альфа (TNF- α) – це цитокін, що бере участь в процесах апоптозу, запалення, імунної відповіді через взаємодію з рецепторами TNFR-1 та TNFR-2. Має білкову природу – є протеїном розміром 17 кДа, що складається зі 157 амінокислотних залишків. TNF- α продукується макрофагами, Т лімфоцитами та натуральними кілерами після активації у вигляді проформи – білка pro-TNF розміром 26 кДа, що піддається протеолізу TNF-конвертуючим ферментом (TACE). TNF- α має таку біологічну активність: може призводити

до геморагічного некрозу, взаємодіє з судинною сіткою пухлин і призводить до гіперпроникності та руйнування судин. Завдяки своїй функціональній активності TNF- α активно використовується в якості протипухлинного препарату при лікуванні сарком, меланом та інших онкологічних захворювань [21]. Широке використання TNF- α обумовило пошук шляхів до регуляції його синтезу та активності, а також подолання проблеми резистентності деяких пухлин до його дії.

p43 є індуктором синтезу TNF, як показало дослідження Park та ін. При цьому сигнальний шлях задіює MAPK (mitogen-activated protein kinase), ERK (extracellular-signal regulated kinase), протеїнкіназу C та фосфоліпазу C. Також під час експериментів було визначено, що p43-залежна деградація I κ B, яка веде до активації NF κ B є одним із шляхів стимуляції синтезу TNF [22].

Дослідження Gnant та ін. показало, що при використанні рекомбінантної вірусної вакцини, що несе ген EMAP-II і відповідно підвищення концентрації цього білку в клітинах пухлин *in vivo*, а саме клітинах людської меланоми раніше нечутливих до TNF- α , новоутворення втрачали резистентність [23]. Схожі результати були отримані Wu та ін. також на клітинах людської меланоми з використанням ретровірусного переносу генів – за умов підвищеної експресії гена EMAP-II пухлини набували чутливості до TNF- α *in vivo*, але не *in vitro* [20]. Можливе пояснення цьому це те, що TNF- α діє на пухлини через судинну сітку, яка відсутня в умовах клітинних культур [24]. Дослідження Lans та ін. також показали, що при перфузії кінцівок щурів і відповідно підвищенні вмісту pro-EMAP та EMAP II в клітинах саркоми, чутливість пухлин до TNF- α підвищувалась [24].

Однією з перших функціональних властивостей, що була визначена для EMAP II є здатність впливати на клітини імунної системи, а саме обумовлювати міграцію моноцитів, хемотаксис для гранулоцитів (нейтрофілів, еозинофілів та базофілів) [7]. Було визначено, що EMAP II володіє потенціалом до підвищення адгезії гранулярних лейкоцитів, а саме нейтрофілів до клітин епітелію за рахунок підвищення секреції P та E-

селектинів. Також під дією ЕМАР II в нейтрофілах підвищувалась концентрація Ca^{2+} , мієлопероксидазна активність, відбувалась індукція хемотаксису [16]. Вплив ЕМАР II на мононуклеарні фагоцити обумовлював підвищення синтезу TNF та інтерлейкіну 8, концентрації Ca^{2+} , а також була спостережена ЕМАР II-індукована міграція [16]. Існують дані стосовно впливу ЕМАР II на лімфоцити. Дослідження Murray та ін. з використанням у якості моделі клітин PBMC (peripheral blood mononuclear cell) та клітинну лінію Т лімфоцитів Jurkat показало наступні результати - рекомбінантний ЕМАР II є індуктором апоптозу активованих лімфоцитів. Була висунута гіпотеза, що така активність може бути шляхом захисту пухлинних клітин від дії імунної системи. Індукція апоптозу в лімфоцитах може відбуватись напряду через взаємодію з рецепторами апоптозу у зв'язку з лігандами родини TNF (FasL та TNF-зв'язаний) або опосередковано через активацію цих лігандів-рецепторів. Також було визначено, що нативний ЕМАР II, який походить з клітин колоректальної карциноми індукує активацію каспази 8 і відповідно апоптичний шлях [25, 26]. Дослідження Clarijs та ін. стосовно дії ЕМАР II на макрофаги на клітинах первинної увеальної меланоми показали, що протеїн міститься в високій концентрації в цитоплазмі пухлинних клітин і при цьому корелює з високою концентрацією макрофагів. При цьому ЕМАР II є індуктором синтезу ICAM-1 в епітеліальних клітинах, які є медіаторами інфільтрації макрофагів [27].

1.2. Використання цитокінів p43 та ЕМАР II: проблема агрегації та її подолання шляхом створення нанокомпозитних комплексів

1.2.1. Агрегація білкових препаратів.

Багато фармацевтичних препаратів мають білкову природу – на сьогодні сертифіковане використання близько 130 протеїнів: це цитокіни як ЕМАР II, антитіла, ферменти та інші сполуки. Широке використання білків обумовлено низкою переваг. Дуже часто протеїни мають високоспецифічні функції або набори функцій, які

поки неможливо забезпечити аналогами іншої хімічної природи. Висока специфічність також обумовлює дуже низький рівень можливих побічних ефектів пов'язаних з втручанням в інші процеси організму. Оскільки більша частина білків, що використовується у якості лікарських препаратів є природно обумовленими, то імунна відповідь буде мінімальна. При лікуванні хвороб генетичної природи, що викликані делеціями чи мутаціями певних генів, використання протеїнів є ефективним і не потребує генної терапії. Нарешті, саме препарати білкової хімічної природи потребують менше часу на випробування і характеризуються більш легкою процедурою патентування [1].

Проте, повноцінному використанню білкових лікарських засобів запобігає декілька перешкод: по-перше, такі фактори як розчинність білку, стабільність та місце введення, можуть негативно вплинути через труднощі при транспорті до цільового місця, дії протеаз, по-друге, використання протеїнів не властивих людині може викликати імунну відповідь і нейтралізувати процес лікування, також багато білків потребують пост трансляційної модифікації, що може ускладнювати процеси створення, а само виробництво може бути коштовним [1].

Нестабільність білків, що обумовлена їхньою агрегацією є проблемою не тільки для фармакології – більше 20 хвороб (хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, хвороба Хантінгтона, пріонні захворювання) є результатом неадекватної агрегації протеїнів, що може бути викликана мутаціями, фізичним та хімічним впливом і тому потребує дослідження [4].

Агрегація білків може бути фізична, в результаті якої протеїни формують конгломерати без зміни в первинній структурі або хімічна з утворенням нових ковалентних зв'язків. Деякі фактори, що впливають на агрегацію білків - це температура, рН, гідрофобні ділянки в структурі білків, іонна сила, концентрація білків в розчині, наявність іонів металів чи органічних розчинників. Агрегаційні форми білків є різноманітними за розмірами, формою, але зазвичай аморфні [4].

Існує декілька шляхів подолання проблеми агрегації, які поділяються на внутрішні – ті, що спрямовані на зміну амінокислотної послідовності білку і відповідно його просторової структури і властивостей, та зовнішні – ті, що спрямовані на модифікацію середовища знаходження протеїну. Модифікація структури відбувається шляхом сайт-спрямованого мутагенезу або за допомогою хімічних перетворень, при цьому дуже важливим є збереження необхідної функціональності. Модифікація середовища є досить розповсюдженим шляхом запобігання агрегації і реалізується через додавання певних сполук (цукри, поліоли, амінокислоти, аміни, солі, полімери, суфрактанти), які стабілізують білки [4]. Також досить ефективним шляхом подолання проблеми агрегації є використання спеціальних лігандів – наприклад, бівалентних іонів металів (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}), які обумовлюють більш жорстку та стабільну структуру білка. Проте деякі білки не стабілізуються металевими іонами, що є стимулом до пошуку нових лігандів [27].

1.2.2. Характеристика декстрану 70 як ліганда при створенні нанокомпозиних комплексів. Декстрини – це родина нейтральних поліцукрів, що побудовані з ланцюгів d-глюкози зв'язаної через α -(1→6) зв'язок (50-97% від глікозидних зв'язків в полімері), або α -(1→2), α -(1→3) та α -(1→4) зв'язки (рис. 1.5.). Полімер є продуктом біосинтезу головним чином Грам-позитивних факультативно анаеробних коків, а саме представників родів *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*) та *Streptococcus*, що синтезують декстран за допомогою 1,6- α -d-глюкан-6- α -глікозил трансферази шляхом переносу залишків d-глюкопіранозилу. Також можливий хімічний синтез декстрану через катіонну полімеризацію з відкриттям кільця з використання левоглюкозану (1,6-ангідро- β -d-глюкози). Розміри полімеру сильно варіюють: так, нативна форма декстрану характеризується розмірами $9 \cdot 10^6$ – $5 \cdot 10^8$ г/моль⁻¹, в медицині використовують декстран з молекулярною масою приблизно $4 \cdot 10^4$, $6 \cdot 10^4$ та $7 \cdot 10^4$ г/моль⁻¹ – декстран 40, 60 та 70 відповідно. В залежності від продуцента та розміру молекул декстран може виявляти

досить різні розчинні властивості, але зазвичай розчиняється в воді, формаміді, гліцерилі. З фізіологічної точки зору декстран є біосумісним, біорозкладним та не виявляє ані імуногенних ані антигенних властивостей, що є однією з причин широкого використання в біомедицинській промисловості. Декстран може бути деполімеризований за допомогою глікозидаз (декстраназ), що зазвичай присутні в печінці, селезінці, нирках та інших органах [28].

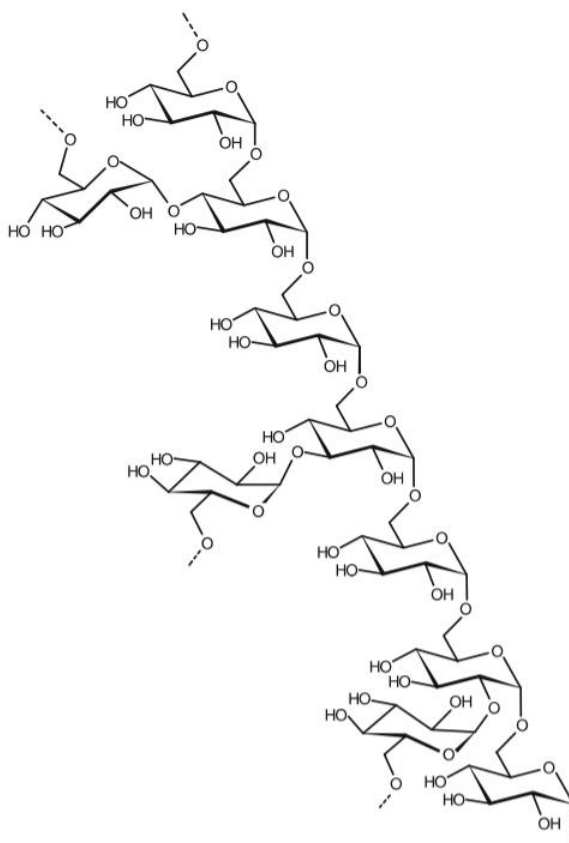


Рис. 1.5. Частина полімерного ланцюга декстрану, зв'язаного через α -(1 $\rightarrow$ 6) зв'язок з розгалуженням в позиціях 2, 3 та 4 [28].

Декстран отримав широке використання в медицині: 6 чи 10 % водний розчин цього полімеру використовують для заміщення крововтрат через здатність забезпечувати колоїдний осмотичний тиск для витягування рідини в плазму з інтерстиціального простору, а завдяки антитромбічним властивостям використовують для лікування тромбозів та післяопераційної

емболії. Також декстран широко використовується в харчовій (виготовлення хлібобулочних виробів), фармацевтичній (компонент офтальмологічних препаратів) та хімічній (синтез пептидів) промисловості, при створенні косметичних засобів [28].

1.2.3. Використання білків р43 та ЕМАР II: підвищення стабільності. Завдяки великій кількості своїх функцій р43 та його протеолітична форма є потенціальними мішенями при лікуванні багатьох захворювань людини. Окрім використання у якості протипухлинного препарату, ці цитокіни є лікувальними при різноманітних захворюваннях легень. Наприклад, існує позитивна кореляція між рівнем ЕМАР II та ділянками апоптозу в легенях у курців, при цьому зниження концентрації білка позитивно впливало на тканину – спостерігалось зниження інфільтрації імунних клітин та підвищення цілісності тканин. Також існує зв'язок між р43, ЕМАР II та неврологічними захворюваннями - було показано, що миші зі зниженою кількістю р43 характеризувались моторною дисфункцією, а саме спостерігалась дегенерація аксонів мотонейронів, поява дефектів нервово-м'язових синапсів [1].

Таким чином, р43 та ЕМАР II мають потенціал до використання у якості лікарських препаратів. Проте головною перешкодою є схильність цих цитокінів до агрегації, яка призводить до змін просторової структури і відповідно, функціональної активності. Для вирішення цієї проблеми було запропоновано підвищити стабільність шляхом введення стабілізуючого ліганду – декстрану 70 у складі нанокompatитного комплексу.

Коломієць та ін. було проведено дослідження впливу декстрану 70 на ЕМАР II. При цьому до складу комплексу входили такі компоненти: ЕМАР II, PBS, NaCl, декстран-70 та дистильована вода, а стехіометрія зв'язування білка з лігандом становить близько 1:1. В комплексі декстран виконував функцію не тільки стабілізатора структури білку, але й кріопротектору [5, 29].

Під час дослідження також були отримані дані стосовно агрегаційної форми ЕМАР II за допомогою веб-серверів для макромолекулярного докінга Cluspro 2.0 та SymmDock. Результати були такі: взаємодія протеїнів відбувається через формування контакту гідрофобного характеру між неструктурованою петлею $^{34}\text{DVGEIAPR}^{41}$ однієї молекули та амінокислотами, що оточують триптофанову ділянку іншої – це забезпечує достатню вільну енергію і можливість агрегації (рис. 1.6.) [29].

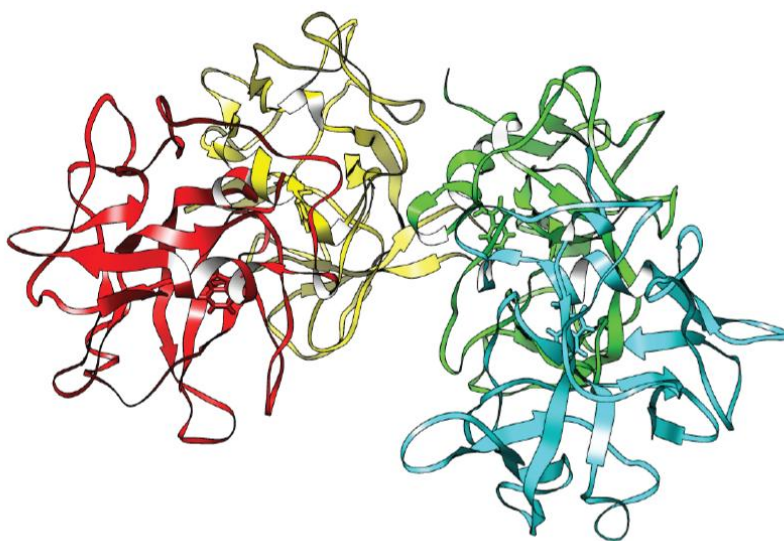


Рис. 1.6. Модель агрегатів ЕМАР II [29].

Наступне дослідження механізму стабілізації ЕМАР II декстраном 70 було також проведено методами комп'ютерного моделювання. Було визначено, що декстран зв'язується з неструктурованою петлею $^{34}\text{DVGEIAPR}^{41}$ та гідрофобною триптофановою ділянкою в структурі білка - місцями, що беруть участь в утворенні агрегатів (рис. 1.7) [5, 29].

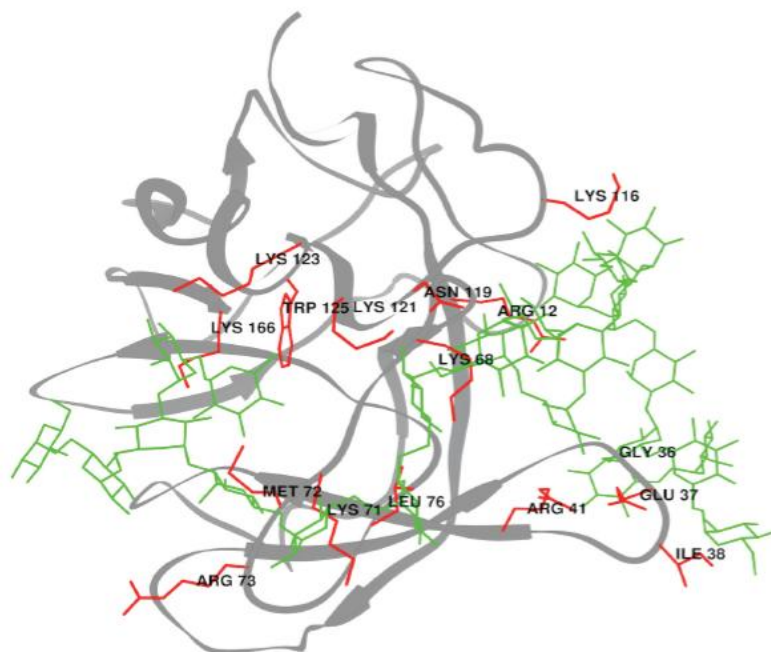


Рис. 1.7. Модель зв'язування ЕМАР II та декстрану 70: червоним кольором зазначені амінокислотні залишки, що зв'язуються з декстраном, зеленим зазначено молекулу декстрану [29].

Токсичність нанокompозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 була досліджена Коломієць та ін. на лініях клітинних культур L929 та PST. При цьому токсичність характеризувалась за MTD (maximum tolerated dose) та CC_{50} (цитотоксична концентрація, що спричиняє загибель 50 % клітин). В результаті було виявлено, що токсичність нанокompозитного комплексу складає: MTD = 25.00 мкг/мл та CC_{50} = 50.00 мкг/мл [5].

Таким чином, використання декстрану 70 для стабілізації ЕМАР II є успішним. Ліганд підвищує стабільність цитокіну за рахунок зв'язування з неструктурованою петлею та триптофаною ділянкою в структурі білка. Підвищення стійкості до агрегації дає можливість початку використання ЕМАР II для лікування.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Характеристика об'єкту дослідження

Об'єктом дослідження був рекомбінантний білок р43 розміром 43 кДа та його нанокмпозитний комплекс з декстраном 70 у якості ліганду. Білок складається з 312 амінокислотних залишків. молекулярна маса декстрану $7 \cdot 10^4$ г/моль.

2.2. Реактиви, матеріали та обладнання

2.2.1. Реактиви. Дистильована вода, бідистильована вода, деіонізована вода, розчин канаміцину 30 мг/мл, ізопропіл- β -тіогалактопіранозид (ІПТГ) 1М, розчин NaCl 5М, розчин NaP, імідазол, β -меркаптоетанол, фенилметилсульфоніл фторид, розчин трис солянокислого, етанол, лізоцим 1 мг/мл, дріжджовий екстракт, триптон, декстран 70 ("Біотика АТ", Словаччина).

2.2.2. Розчини.

1) Середовище Лурія-Бертані:

- дріжджовий екстракт 57
- триптон 10 г
- NaCl 10 г

2) Буфер для діалізу:

- NaCl 150 мМ
- NaP 50 мМ

3) Буфер для елюції:

- NaP 25 мМ

- NaCl 0,15 M
- імідазол 200 мМ

4) Буфер для промивки колонки

- NaP 50 мМ
- NaCl 1 M
- імідазол 1 M
- β -меркаптоетанол

2.2.3. Обладнання. Обладнання: центрифуга К-23, холодильник, ламінарний бокс, термостат, установка для культивування клітин УВМТ-12-250, ультразвуковий дезінтегратор, мікроцентрифуга 1-13 («Sigma», США), спектрофотометр BioMate-5 («Thermo Fisher Scientific», США), лазерний кореляційний спектрофотометр “ZetaSizer–3” («Malvern Panalytical», США).

2.3. Отримання рекомбінантного білка р43

Отримання рекомбінантного білку р43 проводилось генетично-інженерними методами за допомогою раніше оптимізованої схеми, розробленої Бабенко та ін. [30].

Для отримання р43 використовували штам-реципієнт *Esheria coli* BL21(DE3)pLysE (“Stratagene”, США), плазмідний вектор рЕТ28b-р43 (“Novagen”, США) розміром 5368 по з геном цільового білку під контролем промотора фага Е7 та генетичний маркером – геном *kan*, що забезпечує стійкість бактеріальних трансформованих клітин до дії антибіотику канаміцину (рис. 2.1.). Бактеріальна культура *Esheria coli* BL21(DE3)pLysE вирощувалась в середовищі Лурія-Бертані (LB). У якості індуктора експресії було використано ізопропіл- β -тіогалактопіранозид (ІПТГ) до кінцевої концентрації 1,25 мМ в суспензії. Нарощування культури проводилось на терморегульованій установці до досягнення оптимальної оптичної густини ($OD_{600}=0,7-0,9$) бактеріальної суспензії, яка була виміряна за допомогою

спектрофотометра BioMate-5 за довжині хвилі 600 нм. Далі клітини були лізовані за допомогою ультразвукового дезінтегратора та відцентрифуговані протягом 25 хв при 13 000 об/хв.

Для отримання рекомбінантного білку використовували метод метал-хелатувальної хроматографії на колонці з Ni-NTA-агарозою. Для очистки проводили діаліз.

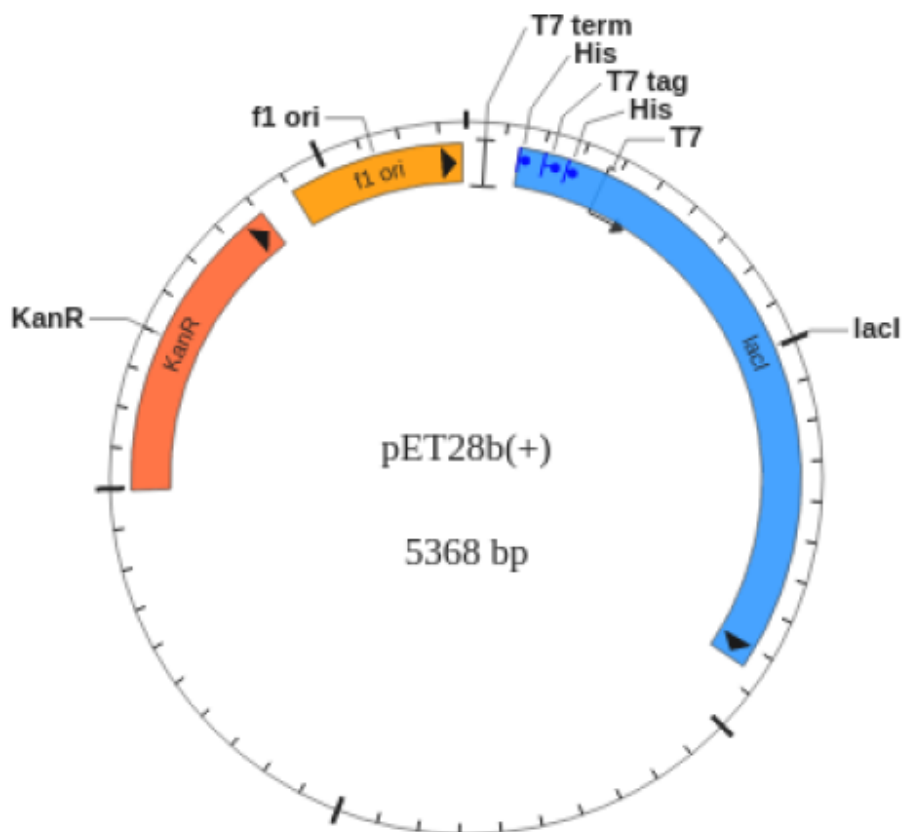


Рис. 2.1. Будова вектора pET28b [31].

Визначення концентрації очищеного білка здійснювалося спектрофотометрично за допомогою спектрофотометру BioMate-5 за довжини хвилі 280 нм. Використовували кварцеві кювети з довжиною оптичного шляху 1 см. При цьому коефіцієнт оптичного поглинання р43 складав 0,281 мг/мл.

Створення нанокompозитного препарату відбувалось згідно запатентованої моделі. При цьому концентрація р43 складала 4,8 мМ, а

декстрану 70 70 мМ. Приготування комплексу відбувалось таким чином: готували розчин білка в Na-фосфатному буфері, далі додавали NaCl та декстран, при цьому показник рН становив 7,5. Отриманий розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин.

2.4. Визначення агрегаційних властивостей нанокompatитного комплексу білка р43 та декстрану методом динамічного розсіювання світла.

Визначення агрегаційних властивостей р43 та його нанокompatитного комплексу проводилось методом динамічного світлорозсіювання на лазерному кореляційному спектрометрі “ZetaSizer-3” обладнаному He-Ne лазером ЛГН-111 ($P = 25$ мВт, $\lambda = 633$ нм). Метод динамічного світлорозсіювання (dynamic light scattering, DLS) або фотон-кореляційна спектроскопія (photon correlation spectroscopy, PCS) – це метод дослідження властивостей розчинів різної природи, а саме використовується для визначення розмірів молекул, агрегації, дослідження взаємодій білків, нуклеїнових кислот та інших молекул та інше. Суть методу полягає в вимірювання Броунівського руху макромолекул при взаємодії з променем світла та наступного визначення розмірів часток з використанням формули Стокса-Ейнштейна [32].

Під час дослідження використовували скляні квадратні кювети об’ємом 1 мл, а у якості дисперсійного агента було використано дистильовану воду. Вимірювання проводили для р43, декстрану 70, комплексу р43 з декстраном 70 за різних температур (25 °С, 37 °С, 42 °С) протягом 60-70 с під час яких приладом було апроксимовано 15 наборів даних. Для отримання більш точних результатів кожен дослід був повторений тричі.

Важливими показниками при вимірювання є наступні. Z – average size – середній гідродинамічний діаметр, також відомий як середній аналіз кумулянтів – це середній гідродинамічний розмір часток [33]. Цей показник

використовується для оцінки якості, порівняння результатів інших досліджень методом DLS в тому ж дисперсанти, а також розрахунку полідисперсності. PdI – полідисперсність або індекс полідисперсності (polydispersity index, PdI) – це показник, що використовується для опису ширини розподілу часток за їх розмірами, при цьому якщо $PdI < 20 \%$, то зразок вважається монодисперсним. В'язкість (η) використовується для розрахунку гідродинамічного діаметру [34].

Для обробки результатів отриманих методом динамічного розсіювання світла використовували відповідне програмне забезпечення - Zetasizer family software v7.13, а також офісний пакет Microsoft Office.

2.5. Біоінформатичний аналіз вторинної структури білка p43

З метою отримання базових параметрів білка p43 було використано сервіс ProtParam, який за амінокислотною послідовністю визначає біохімічні та біофізичні показники. Для передбачення вторинної структури p43 було використано сервіс Phyre2 (Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0). Амінокислотна послідовність білка p43 була отримана з використання бази даних UniProt (код доступу: Q12904)

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Отримання рекомбінантного білка p43

Компетентні клітини *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE було трансформовано за допомогою вектора pET28b-p43, у складі якого був ген цільового білка – p43. Ефективність трансформації була перевірена за допомогою висівання на середовище з канаміцином. Для виділення рекомбінантного білка було спочатку проведено лізис клітин за допомогою ультразвукового дезінтегратора, а далі метал-хелатувальна хроматографія на колонці з Ni-NTA-агарозою. Для очистки використовували метод діалізу.

Визначення концентрації проводили спектрофотометричним методом (рис. 3.1). Аналіз спектру показав, що концентрація зразка отриманого p43 складає 0,17 мг/мл.

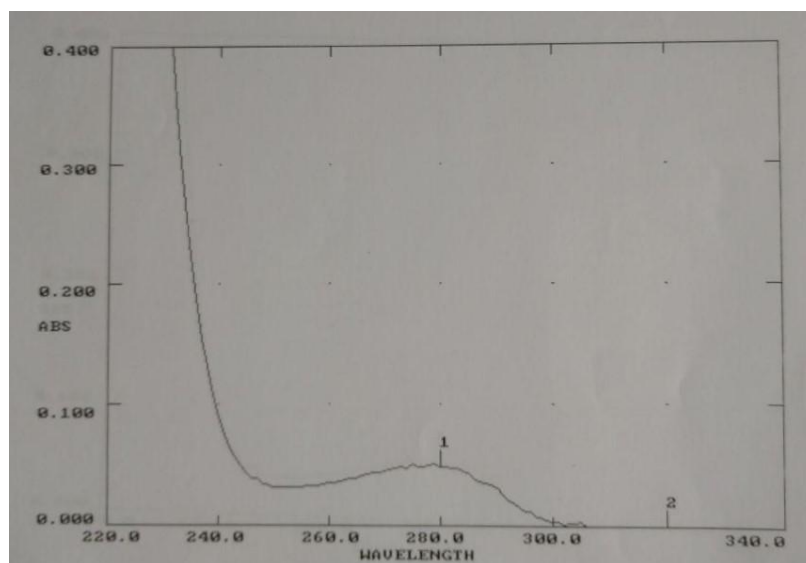


Рис. 3.1. Спектр поглинання отриманого білка p43.

3.2. Дослідження агрегації білка р43 у складі нанокompозитного комплексу за допомогою динамічного розсіювання світла

Визначення агрегаційного потенціалу нанокompозитного комплексу було здійснено за допомогою методу динамічного розсіювання світла з використанням лазерного кореляційного спектрометра “ZetaSizer–3”. Отримані дані по деяким важливим показникам представлені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Результати дослідження методом DLS

№	Зразок	T, °C	Z-Average, нм	Середній Z-Average, нм	PdI	Середній PdI	В'язкість, Па*с
1	р43 (1)	25	178,9	176,50	0,302	30,00%	0,8872
2	р43 (2)		176,1		0,292		0,8872
3	р43 (3)		174,5		0,306		0,8872
4	декстран 70 (1)	25	45,65	188,35	0,514	53,13%	0,8872
5	декстран 70 (2)		111,2		0,504		0,8872
6	декстран 70 (3)		408,2		0,576		0,8872
7	р43 + декстран 70 (1)	25	44,21	33,42	0,487	58,13%	0,8872
8	р43 + декстран 70 (2)		30,38		0,589		0,8872
9	р43 + декстран 70 (3)		25,66		0,668		0,8872
10	р43 + декстран 70 (1)	37	50,21	42,94	0,605	70,67%	0,6864
11	р43 + декстран 70 (2)		40,22		0,719		0,6864
12	р43 + декстран 70 (3)		38,4		0,796		0,6864
13	р43 + декстран 70 (1)	42	64,33	66,27	0,743	76,37%	0,6864
14	р43 + декстран 70 (2)		65,94		0,761		0,6864
15	р43 + декстран 70 (3)		68,55		0,787		0,6864

Спочатку було досліджено зразки p43 та декстрану 70 окремо за кімнатної температури ($t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$). При цьому кожен дослід складався з 3 вимірів для отримання більш точним результатів.

Відповідно до отриманих спектрів можна зробити висновок, що за кімнатної температури зразок p43 є полідисперсним ($\text{PdI} = 30\%$), середній гідродинамічний діаметр для 3 вимірів складає 176,5 нм, що значно перевищує теоретичні данні і може свідчити про утворення агрегатів, пік інтенсивності спостерігається для узагальненого Z-Average 247,4 нм (рис. 3.2)

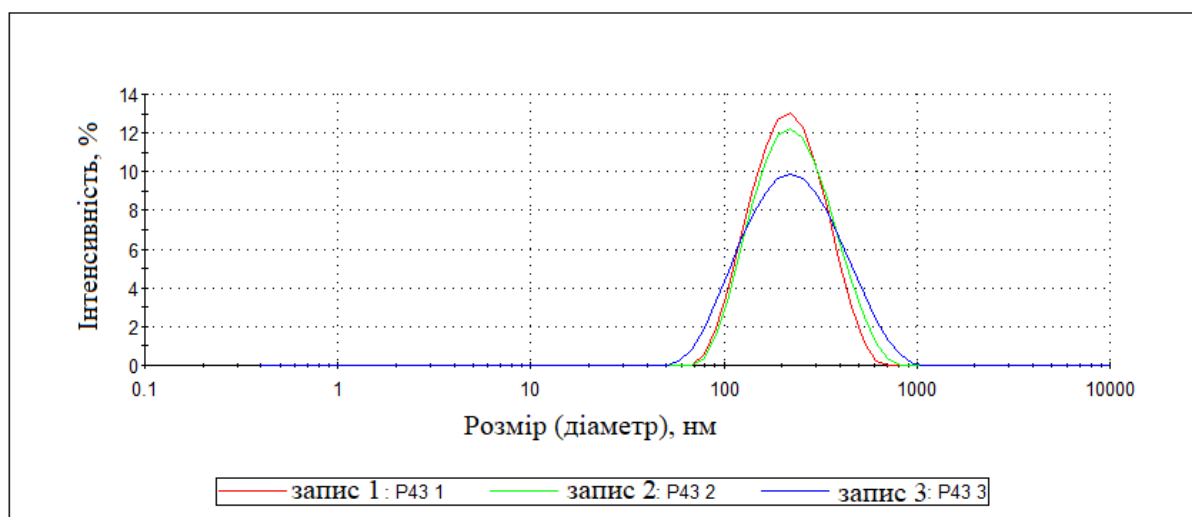


Рис. 3.2. Розподіл середнього гідродинамічного розміру в залежності від інтенсивності світла для білка p43.

Зразок декстрану 70 також є полідисперсним, але в значно більшій мірі ($\text{PdI} = 53\%$), при цьому спостерігається декілька піків інтенсивності, що відповідні до середнього гідродинамічного розміру в 9,9 нм та 599 нм. Також виявлено, що зразок характеризується низькою седиментаційною стабільністю (рис. 3.3).

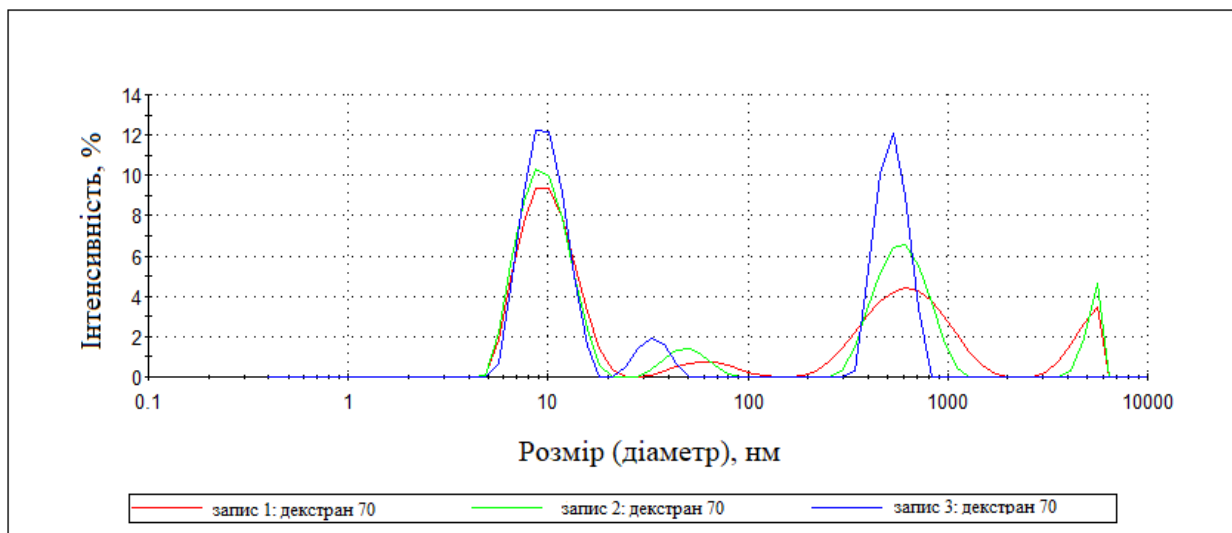


Рис.3.3. Розподіл середнього гідродинамічного розміру в залежності від інтенсивності світла для декстрану 70.

Наступним етапом було дослідження нанокompозитного комплексу р43 з декстраном 70 за температур 25, 37 та 42 °С (рис. 3.4). Значення температур були підбрані до фізіологічно важливих, оскільки р43 розглядається як потенційний лікарський препарат для людини. Нанокompозитний комплекс р43 з декстраном 70 характеризується значною полідисперсністю, яка збільшується з підвищенням температури з 58 до 76 %, також відбувається збільшення середнього гідродинамічного розміру з 33 до 66 нм. При цьому комплекс характеризується седиментаційною стабільністю. Середній гідродинамічний діаметр агрегатів складає 11,9 нм (1 пік), 417,5 (2 пік) для $t = 25$ °С, 11,5 нм (1 пік), 434,1 нм (2 пік) для $t = 37$ °С та 12,4 (1 пік), 468,1 нм (2 пік) для $t = 42$ °С.

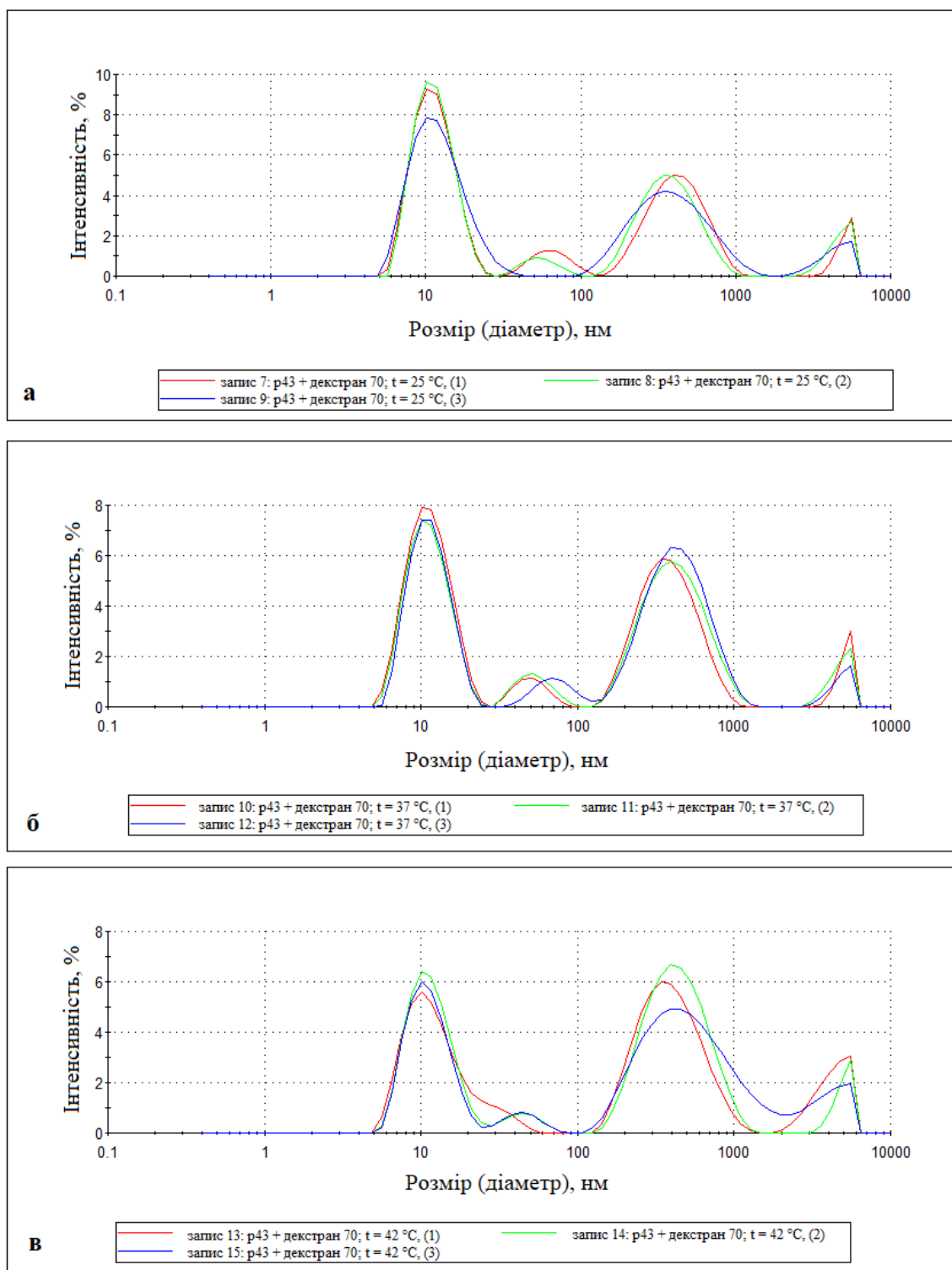


Рис. 3.4. Розподіл середнього гідродинамічного розміру в залежності від інтенсивності світла для нанокompозитного комплексу p43 + декстран 70: а – за $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, б – $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, в – $42\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Було проведено узагальнення результатів шляхом візуалізації залежності середнього гідродинамічного діаметру від температури (рис. 3.5).

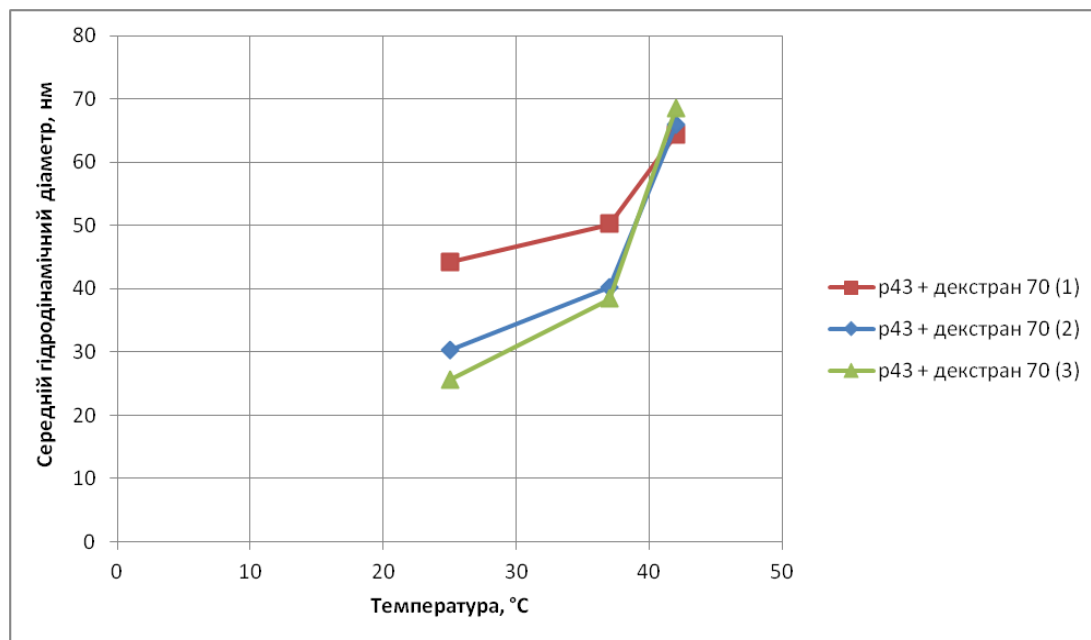


Рис. 3.5. Залежність середнього гідродинамічного діаметру наноконкомпозитного комплексу від температури.

Визначено, що відбувається збільшення середнього гідродинамічного розміру у 2 рази згідно з табл. 3.1. Оскільки очікуванні розміри агрегатів значно більші, згідно з літературними даними, то можна стверджувати, що декстран 70 стабілізує білок р43 [29, 35].

3.3. Біоінформатичний аналіз вторинної структури білка р43.

Результати пошуку базових параметрів білка р43 за допомогою сервісу ProtParam такі. Визначено, що кількість амінокислот, що складають р43 дорівнює 312, молекулярна вага: 34352.66, теоретична ізоелектрична точка – 8.61. Амінокислотний склад представлено в таблиці 3.2. При цьому загальна

кількість негативно заряджених залишків дорівнює (Asp + Glu) 44, а позитивно заряджених (Arg + Lys) – 48.

Таблиця 3.2

Амінокислотний склад р43

Амінокислота	Кількість залишків	%
Ala (A)	23	7.4%
Arg (R)	11	3.5%
Asn (N)	13	4.2%
Asp (D)	14	4.5%
Cys (C)	5	1.6%
Gln (Q)	19	6.1%
Glu (E)	30	9.6%
Gly (G)	20	6.4%
His (H)	4	1.3%
Ile (I)	23	7.4%
Leu (L)	24	7.7%
Lys (K)	37	11.9%
Met (M)	8	2.6%
Phe (F)	4	1.3%
Pro (P)	17	5.4%
Ser (S)	19	6.1%
Thr (T)	13	4.2%
Trp (W)	1	0.3%
Tyr (Y)	3	1.0%
Val (V) 2	24	7.7%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

Також були розраховані такі параметри як орієнтовний період напівжиття, який залежить від амінокислот на N-кінці – у даному випадку метіоніну і дорівнював 30 годин для ретикулоцитів ссавців (*in vitro*), 20+ годин для клітин дріжджів (*in vivo*) та 10+ годин для клітин *Escherichia coli*

(*in vivo*). Індекс нестабільності склав 42,55, що характеризує протеїн як нестабільний, аліфатичний індекс склав 88.43.

Через нестабільність повна структура р43 досі залишається невизначеною, хоча існує декілька моделей для його протеолітичної форми – цитокіну ЕМАР II. З метою передбачення вторинної структури р43 було використано сервіс Phyre2. Результати моделювання вторинної структури за амінокислотною послідовністю представлені на рис. 3.6.



Рис. 3.6. Результати передбачення вторинної структури та неупорядкованих регіонів за допомогою Phyre2.

Визначено, що структура р43 на 33 % представлена α -спіралями, на 22 % представлена β -шарами та 29 % відповідають неупорядкованим або

неструктурованим ділянкам. При аналізі було відмічено, що невпорядковані ділянки включають місця зв'язування білка з декстраном 70. Дані щодо сайтів зв'язування було отримано Коломієць та ін. [34], при цьому амінокислотними залишками, що беруть участь в створенні в формування комплексу білка з декстраном 70 є такі: Lys122, Lys126, Lys133, Glu135, Lys136, Lys137, Gln139, Ser140, Lys214, Pro266, Trp271, Glu272, Gln273, Gln275, Lys269, Lys312. Відповідно, за виключенням залишків Pro266, Trp271, Glu272, Gln273, Gln275 та Lys269, декстран 70 зв'язується з білком p43 в невпорядкованих ділянках (рис. 3.7).

10	20	30	40	50	
MANND	AVLKR	LEQKGAEADQ	II EYLKQQVS	LLKEKAILQA	TLREEKKLRV
60	70	80	90	100	
ENAKLKKEIE	ELKQELIQAE	IQNGVKQIPF	PSGTPLHANS	MVSENVIQST	
110	120	130	140	150	
AVTTVSSGTK	EQIKGGTGDE	KKAKEKIEKK	GEKKKKQQS	IAGSADSKPI	
160	170	180	190	200	
DVSRLDLRIG	CIITARKHPD	ADSLYVEEVD	VGEIAPRTVV	SGLVNHVPLE	
210	220	230	240	250	
QMQRNRMVILL	CNLKPAKMRG	VLSQAMVMCA	SSPEKIEILA	PPNGSVPGDR	
260	270	280	290	300	
ITFDAFPGEP	DKELNPKK KI	WEQIQPDLHT	NDECVATYKG	VPFEVKGKGV	
310					
CRAQTMSNSG	IK				

Рис. 3.7. Амінокислотна послідовність білка p43: невпорядковані ділянки зазначено сірим, сайти зв'язування p43 та декстрану зазначено червоним.

Отже, за результатами біоінформатичного дослідження білок p43 є нестабільним. Спроби передбачити вторинну структури виявили, що наявні неструктуровані ділянки включають сайти зв'язування декстрана 70 з білком, що є можливим механізмом стабілізації та підставою для подальшого дослідження впливу на стабільність та створення генетично-модифікованих протеїнів.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

З метою підвищення стабільності цитокіну р43 для можливості подальшого використання як лікарського засобу та фундаментальних досліджень було створено наноконкомпозитний комплекс білка р43 з декстраном 70 у якості стабілізуючого агента. Результати дослідження методом динамічного розсіювання світла показали, що декстран 70 дійсно стабілізує білок р43 з підвищенням температури, а саме відбувається збільшення гідродинамічного розміру лише в 2 рази, при цьому комплекс можна охарактеризувати як седиментаційно стабільний. Отриманні дані корелюють з результатами інших досліджень. Наприклад, Коломієць та ін. [35] було визначено вплив декстрану 70 на р43 іншим методом, а саме флуоресцентною спектроскопією, при цьому комплекс був більш стабільним ніж вільний протеїн. Також Коломієць та ін. [29] було проведено аналогічне дослідження щодо впливу декстрану 70 на протеолітичну форму білка р43. Визначено, що декстран значно стабілізує ЕМАР II, при цьому в ході експерименту було виявлено, що навіть за кімнатної температури відбувалась агрегація білка, що співпадає з отриманими даними роботи. Воробйова та ін. [36] намагались стабілізувати р43 за допомогою іншого ліганду – β -циклодекстину і отримали позитивні результати.

Декстран було обрано у якості стабілізуючого агента, оскільки однією з вимог щодо підбору ліганду є відсутність токсичного впливу на організм. Декстран є оптимальним у такому випадку, оскільки цей полімер є біосумісним і вже використовується в харчовій, фармацевтичній та хімічній промисловості, і при цьому є доступним [28]. Fei Wu та ін. проводили дослідження стосовно стабілізації та інкапсулювання протеїнів декстраном на прикладі альбуміну бичачої сироватки, гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактору (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору

(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), β -галактозидази та міоглобіну. Результати показали, що використання декстрану для створення наночасток є ефективним – частинки були зручного розміру, не відбувалось агрегації протеїнів під час інкапсуляції та біологічна активність зберігалась на високому рівні [37]. Таким чином, декстран є ефективним для підвищення стабільності протеїнів.

Проведений біоінформатичний аналіз p43 підтвердив, що білок є нестабільним (індекс нестабільності – 42,55), а також дозволив визначити кількісний склад елементів вторинної структури. Під час аналізу було виявлено, що невідповідності ділянки в структурі відповідають місцям зв'язування з декстраном, що дає можливість припущення механізму стабілізації, а у подальшому створення генетично-модифікованих форм.

Таким чином, стабілізація цитокіну p43 є можливою, що також підтвердилось у даній роботі. Далі можливо почати дослідження стосовно використанню p43 та його протеолітичної форми у якості лікарського протипухлинного засобу після підбору оптимальних концентрацій, також стабілізація білку шляхом створення комплексу дозволяє проводити фундаментальні дослідження білку, оскільки p43 характеризується не тільки як протипухлинний агент, але й білок, що бере участь в ембріональному розвитку, в процесах функціонування імунної системи. Також наступним етапом може бути вдосконалення даних щодо молекулярних механізмів агрегації, відбір найбільш ефективних та безпечних лігандів, а також визначення критичних температур початку агрегації, можливий вплив різних буферних систем та вдосконалення схеми отримання та очищення білку.

ВИСНОВКИ

1) Отримано рекомбінантний білок р43 за допомогою бактеріальних систем експресії та на його основі створено нанокмпозитний комплекс з декстраном 70 у якості ліганду для підвищення стійкості до агрегації.

2) У складі нанокмпозитного комплексу декстран 70 як біосумісний стабілізувальний агент підвищує стійкість до агрегації білка р43 з підвищенням температури.

3) Передбачення вторинної структури білка р43 методами біоінформатичного аналізу показало, що невідпорядковані ділянки в структурі р43 включають місця зв'язування стабілізувального агента – декстрану 70 з протеїном.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Leader, B., Baca, Q. J., & Golan, D. E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(1), 21–39. doi:10.1038/nrd2399
2. Van Horssen, R., Eggermont, A. M. M., & ten Hagen, T. L. M. (2006). Endothelial monocyte-activating polypeptide-II and its functions in (patho)physiological processes. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 17(5), 339–348. doi:10.1016/j.cytogfr.2006.08.001
3. Quevillon, S., Agou, F., Robinson, J.-C., & Mirande, M. (1997). The p43 Component of the Mammalian Multi-synthetase Complex Is Likely To Be the Precursor of the Endothelial Monocyte-activating Polypeptide II Cytokine. *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32573–32579. doi:10.1074/jbc.272.51.32573
4. Wang, W. (2005). Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International Journal of Pharmaceutics*, 289(1-2), 1–30. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.11.014
5. Коломієць-Бабенко, Богорад-Кобелська О. С., Співак М. Я., Корнелюк О. І. (2016). Вплив нанокompозитного препарату ЕМАР ІІ на продукцію фактора некрозу пухлин та інтерферона *in vitro*. *Biotechnologia Acta*, V. 9, No 5. doi: 10.15407/biotech9.05.018
6. Wolfe, C. L., Warrington, J. A., Davis, S., Green, S., & Norcum, M. T. (2009). Isolation and characterization of human nuclear and cytosolic multisynthetase complexes and the intracellular distribution of p43/EMAPII. *Protein Science*, 12(10), 2282–2290. doi:10.1110/ps.03147903
7. Kao J, Ryan J, Brett G, et al. Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. *J Biol Chem*. 1992;267(28):20239-20247.
8. Knies UE, Kröger S, Clauss M. Expression of EMAP II in the developing and adult mouse. *Apoptosis*. 2000;5(2):141-151. doi:10.1023/a:1009632712876

9. Behrendorf HA, van de Craen M, Knies UE, Vandenabeele P, Clauss M. The endothelial monocyte-activating polypeptide II (EMAP II) is a substrate for caspase-7. *FEBS Lett.* 2000;466(1):143-147. doi:10.1016/s0014-5793(99)01777-9
10. Zhang FR, Schwarz MA. Pro-EMAP II is not primarily cleaved by caspase-3 and -7. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282(6):L1239-L1244. doi:10.1152/ajplung.00141.2001
11. Ложко, Дмитро & Корнелюк, Олександр. (2016). Model of spatial structure of human AIMP1/p43 protein. *ScienceRise: Biological Science.* 41-46. 10.15587/2519-8025.2016.81822.
12. Kim Y, Shin J, Li R, Cheong C, Kim K, Kim S. A novel anti-tumor cytokine contains an RNA binding motif present in aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem.* 2000;275(35):27062-27068. doi:10.1074/jbc.C000216200
13. UniProt. [Интернет]. Available from: <https://www.uniprot.org>
14. Liang D, Halpert MM, Konduri V, Decker WK. Stepping Out of the Cytosol: AIMP1/p43 Potentiates the Link Between Innate and Adaptive Immunity. *Int Rev Immunol.* 2015;34(5):367-381. doi:10.3109/08830185.2015.1077829
15. Park SG, Kang YS, Ahn YH, et al. Dose-dependent biphasic activity of tRNA synthetase-associating factor, p43, in angiogenesis. *J Biol Chem.* 2002;277(47):45243-45248. doi:10.1074/jbc.M207934200
16. Kao J, Houck K, Fan Y, et al. Characterization of a novel tumor-derived cytokine. Endothelial-monocyte activating polypeptide II. *J Biol Chem.* 1994;269(40):25106-25119.
17. Berger, A. C., Alexander, H. R., Tang, G., Wu, P. S., Hewitt, S. M., Turner, E., ... Libutti, S. K. (2000). Endothelial Monocyte Activating Polypeptide II Induces Endothelial Cell Apoptosis and May Inhibit Tumor Angiogenesis. *Microvascular Research*, 60(1), 70–80. doi:10.1006/mvre.2000.2249
18. Tandle, A. T., Mazzanti, C., Alexander, H. R., Roberts, D. D., & Libutti, S. K. (2005). Endothelial monocyte activating polypeptide-II induced gene expression changes in endothelial cells. *Cytokine*, 30(6), 347–358. doi:10.1016/j.cyto.2005.01.020

19. Tandle, A. T., Calvani, M., Uranchimeg, B., Zahavi, D., Melillo, G., & Libutti, S. K. (2009). Endothelial monocyte activating polypeptide-II modulates endothelial cell responses by degrading hypoxia-inducible factor-1alpha through interaction with PSMA7, a component of the proteasome. *Experimental Cell Research*, 315(11), 1850–1859. doi:10.1016/j.yexcr.2009.03.021
20. Lee YS, Han JM, Kang T, Park YI, Kim HM, Kim S. Antitumor activity of the novel human cytokine AIMP1 in an in vivo tumor model. *Mol Cells*. 2006;21(2):213-217.
21. van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist*. 2006;11(4):397-408. doi:10.1634/theoncologist.11-4-397
22. Park H, Park SG, Kim J, Ko YG, Kim S. Signaling pathways for TNF production induced by human aminoacyl-tRNA synthetase-associating factor, p43. *Cytokine*. 2002;20(4):148-153. doi:10.1006/cyto.2002.1992
23. Gnant MF, Berger AC, Huang J, et al. Sensitization of tumor necrosis factor alpha-resistant human melanoma by tumor-specific in vivo transfer of the gene encoding endothelial monocyte-activating polypeptide II using recombinant vaccinia virus. *Cancer Res*. 1999;59(18):4668-4674.
24. Lans TE, Van Horssen R, Eggermont AM, Ten Hagen TL. Involvement of endothelial monocyte activating polypeptide II in tumor necrosis factor-alpha-based anti-cancer therapy. *Anticancer Res*. 2004;24(4):2243-2248.
25. Murray JC, Heng YM, Symonds P, et al. Endothelial monocyte-activating polypeptide-II (EMAP-II): a novel inducer of lymphocyte apoptosis. *J Leukoc Biol*. 2004;75(5):772-776. doi:10.1189/jlb.1003487
26. Murray, J. C., Symonds, P., Ward, W., Huggins, M., Tiga, A., Rice, K., ... Robins, R. A. (2003). Colorectal Cancer Cells Induce Lymphocyte Apoptosis by an Endothelial Monocyte-Activating Polypeptide-II-Dependent Mechanism. *The Journal of Immunology*, 172(1), 274–281. doi:10.4049/jimmunol.172.1.274

27. Clarijs R, Schalkwijk L, Ruiter DJ, de Waal RM. EMAP-II expression is associated with macrophage accumulation in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(5):1801-1806. doi:10.1167/iovs.02-0624
28. Heinze, T., Liebert, T., Heublein, B., & Hornig, S. (n.d.). Functional Polymers Based on Dextran. *Advances in Polymer Science*, 199–291. doi:10.1007/12_100
29. Л. А. Коломієць, Д. М. Ложко, В. М. Заєць, О. Ю. Чуніхін, Н. В. Гордовська, О. І. Корнелюк. (2019). Вплив декстрану 70 на агрегацію протипухлинного цитокіна ЕМАР ІІ. *Науковий журнал «Мікробіологія і біотехнологія»*, 3(47). doi: 10.18524/2307-4663.2019.3(47).182815
30. 29. Л.А. Бабенко, О.Ю. Скоробогатов, О.Л. Дубровський, О.І. Корнелюк. (2010). Оптимізація бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР ІІ в клітинах *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE. *Науковий журнал «Мікробіологія і біотехнологія»*, 3.
31. DNASU Plasmid [Інтернет]. Available from: <http://dnasu.org/>
32. Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409–427. doi:10.1007/s12551-016-0218-6
33. Kaszuba, M., McKnight, D., Connah, M. T., McNeil-Watson, F. K., & Nobbmann, U. (2007). Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(5), 823–
34. Arzenšek, Dejan. (2010). Dynamic light scattering and application to proteins in solutions. Seminar University of Ljubljana. 1-18.
35. Kolomiiets, L. A., Vorobyova, N. V., Lozhko, D. M., Zayets, V. M., & Kornelyuk, A. I. (2020). Stabilization of AIMP1/p43 and EMAP II recombinant proteins in the complexes with polysaccharide dextran-70. *Pharmacological Reports*. doi:10.1007/s43440-019-00016-x
36. Воробйова Н., Корнелюк О. І., Ложко Д. (2016). Стабільність рекомбінантного білка AIMP1/p43 людини в нанокмпозитному комплексі з бета-циклодекстрином. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. 15-18.

37. Wu F, Zhou Z, Su J, Wei L, Yuan W, Jin T. Development of dextran nanoparticles for stabilizing delicate proteins. *Nanoscale Res Lett.* 2013;8(1):197. Published 2013 Apr 27. doi:10.1186/1556-276X-8-197