

УДК 577.2

СРЕДИ АНТИТЕЛОПОДОБНЫХ МОЛЕКУЛ, МОНОБОДИ, СПОСОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ С НУКЛЕОКАПСИДНЫМ БЕЛКОМ ВИРУСА SARS-CoV, ЕСТЬ МОНОБОДИ С ВЫСОКИМ СРОДСТВОМ К НУКЛЕОКАПСИДНОМУ БЕЛКУ ВИРУСА SARS-CoV-2

© 2022 г. Ю. В. Храмцов¹, А. В. Уласов¹, Т. Н. Лупанова¹,
академик РАН Г. П. Георгиев¹, член-корреспондент РАН А. С. Соболев^{1,2,*}

Поступило 27.10.2021 г.

После доработки 21.12.2021 г.

Принято к публикации 21.12.2021 г.

Из литературных данных взяты семь аминокислотных последовательностей антителоподобных молекул, монободы, способных взаимодействовать с нуклеокапсидным белком вируса SARS-CoV. Методом синтеза гена получены нуклеотидные последовательности генов монободы, которые были проэкспрессированы в *E. coli* и выделены, используя Ni-NTA хроматографию. Методом термофореза было показано, что три из семи выбранных антителоподобных молекул могут с высоким сродством (константа диссоциации десятки нМ) взаимодействовать с нуклеокапсидным белком вируса SARS-CoV-2. Для оставшихся четырех монободы было обнаружено только низкоаффинное связывание с константой диссоциации в несколько мкМ.

Ключевые слова: SARS-CoV, SARS-CoV-2, нуклеокапсидный белок, антителоподобные молекулы, монободы, термофорез

DOI: 10.31857/S2686738922020111

Пандемия коронавируса SARS-CoV-2 продемонстрировала актуальность разработки новых противовирусных препаратов. Классические ингибиторы вирусной активности представляют собой низкомолекулярные соединения, способные встраиваться в полости вирусных белков [1]. Однако, когда вирусные белки не имеют таких полостей, то к ним тяжело подобрать эффективный ингибитор. Напротив, антитела с высокой специфичностью и аффинностью можно получить для практически любого белкового антигена. Более того, это не обязательно должны быть природные антитела, но различные подобные антителам молекулы, обладающие помимо нужной специфичности и аффинности значительно меньшим, по сравнению с природными антителами, размером [2]. Для вируса SARS-CoV-2 потенциальной вирусной мишенью может быть нуклеокапсидный белок, или N-белок. Он связывается с вирусной РНК и принимает активное участие в сборке и

упаковке вируса [3, 4], а также имеет целый ряд других важных для вируса функций, таких, например, как репликация и транскрипция вирусной РНК [5]. Учитывая, что гомология N-белков для вирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV составляет более 90% [6], антителоподобные молекулы, способные взаимодействовать с N-белком вируса SARS-CoV, теоретически могут взаимодействовать и с N-белком вируса SARS-CoV-2. Однако гомология не все определяет в данном вопросе и в каждом конкретном случае это предположение можно проверить только экспериментально. В данной работе мы использовали семь монободы (Fn-N) к N-белку вируса SARS-CoV, антителоподобных молекул, созданных на основе десятого домена фибронектина 3 типа человека [7]. Методом термофореза были определены константы диссоциации комплекса Fn-N и N-белка вируса SARS-CoV-2. Обнаружено, что высоким сродством к N-белку обладают только три из данных семи антителоподобных молекул.

Генно-инженерными методами были получены семь плазмид, каждая из которых содержала ген, кодирующий антителоподобную молекулу с His-тагом, а также плазида, кодирующая N-белок SARS-CoV-2 с His-тагом (ShineGene). Далее, каждой из этих плазмид трансформировался

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: alsobolev@yandex.ru

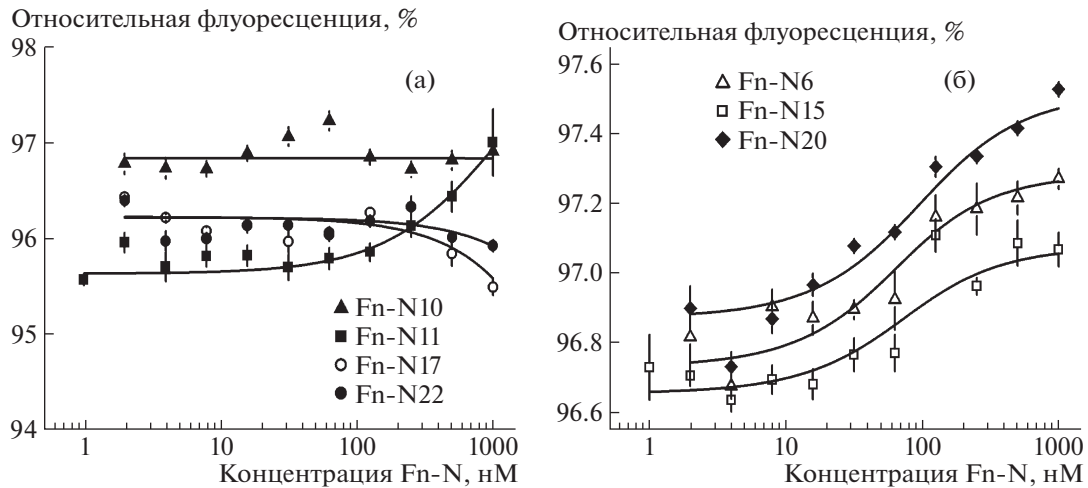


Рис. 1. Зависимости относительной флуоресценции (за 100% принята флуоресценция до начала термофореза) через 20 с после начала термофореза от концентрации Fn-N при постоянной концентрации N-белка (40 нМ) для Fn-N с низким сродством к N-белку (а) и с высоким сродством к N-белку (б). Указана среднеквадратичная ошибка определения относительной флуоресценции (8–12 повторов).

штамм *E. coli* BL21(DE3). Индукцию экспрессии Fn-N и N-белка проводили 500 мкМ IPTG в течение 20 ч при 16°C для Fn-N и в течение 3 ч при 37°C для N-белка. Fn-N и N-белок выделяли из нерастворимой фракции [8], а затем очищали аффинной хроматографией на носителе Protino® Ni-TED Resin. Выделенные белки хранили в буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 8.

Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле продемонстрировал достаточную степень чистоты полученных белков (98.9% для N-белка и 92.1%, 84.7%, 58.1%, 81.9%, 97.2%, 89.1%, 96.7% для Fn-N6, Fn-N10, Fn-N11, Fn-N15, Fn-N17, Fn-N20 и Fn-N22 соответственно). Белок Fn-N11 подвергается частичному гидролизу, что может сказаться на точности определения константы взаимодействия данной антителоподобной молекулы с N-белком.

Взаимодействие Fn-N с N-белком изучалось методом термофореза на приборе Monolith NT.115 Series (“NanoTemper Technologies GmbH”, Германия) в буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7. Для предотвращения агрегации антителоподобных молекул в буфер добавляли 70 мМ имидазола. Чтобы исключить адсорбцию N-белка, на используемых в термофорезе капиллярах в буфер добавлялся 0.005–0.01% SDS. N-белок был помечен флуоресцентным красителем ATTO647. Для этого в 65 мМ карбонатном буфере (pH 8.5) к N-белку был добавлен полутора кратный мольный избыток активированного эфира красителя ATTO647 с дальнейшей инкубацией 1 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. N-белок со связавшимся ATTO647 отделили от свободного красителя на хроматографической колонке PD10. Степень модификации N-белка

красителем ATTO647 составила 0.76. Метод термофореза заключается в нагревании инфракрасным лазером части капилляра с образцом и измерения флуоресценции образца [9]. Уровень этой флуоресценции меняется в процессе образования комплекса между антителоподобной молекулой и N-белком.

При фиксированной концентрации N-ATTO647 (40 нМ) методом термофореза были получены зависимости относительной флуоресценции (за 100% принята флуоресценция до начала термофореза) через 20 с после начала термофореза от концентрации Fn-N (рис. 1). Для каждого эксперимента получали четыре таких зависимости, и весь эксперимент повторяли два-три раза. По каждой кривой определялась константа диссоциации комплекса Fn-N с N-белком, ее усредняли по всем 8–12 кривым и определяли относительную ошибку ее измерения. Для Fn-N10 не наблюдалось заметного связывания с N-белком (рис. 1а). А для Fn-N11, Fn-N17 и Fn-N22 (рис. 1а) константы диссоциации с N-белком составили 2.7 ± 0.6 , 3.0 ± 0.5 и 2.9 ± 0.9 мкМ соответственно. Такие высокие константы диссоциации говорят о неспецифическом взаимодействии указанных молекул с N-белком. Высокоаффинное взаимодействие с N-белком наблюдалось для Fn-N6, Fn-N15 и Fn-N20 (рис. 1б). Для них константы диссоциации с N-белком составили 31 ± 7 , 24 ± 4 и 66 ± 12 нМ соответственно.

Таким образом, из семи антителоподобных молекул к N-белку вируса SARS-CoV только три взаимодействуют с высоким сродством с N-белком вируса SARS-CoV-2. Ранее в литературе, основываясь на высокой гомологии N-белка для этих двух вирусов, Du Y. et al. [10] предполагали,

что Fn–N17 и Fn–N22 будут хорошо связываться и с N-белком вируса SARS-CoV-2. Однако полученные нами данные показывают, что это не так и для этих антителоподобных молекул наблюдается только низкоаффинное взаимодействие с N-белком вируса SARS-CoV-2 (рис. 1а). Наилучшим сродством к N-белку обладает антителоподобная молекула Fn–N15. Согласно литературным данным, она взаимодействует с С-концевым доменом N-белка [7]. Для ингибирования взаимодействия N-белка с РНК наибольший интерес представляет Fn–N20, взаимодействующая с N-концевым доменом N-белка [7]. Возможно, именно поэтому в работе 2009 г. для SARS-CoV из этих трех антителоподобных молекул Fn–N20 лучше всего ингибирует наработку как вирусной РНК, так и самих вирусных частиц [7].

В результате проведенной работы нами было продемонстрировано, что три из семи ранее описанных монободии, связывающихся с нуклеокапсидным белком вируса SARS-CoV, способны также взаимодействовать с N-белком вируса SARS-CoV-2. Данные антителоподобные молекулы могут послужить основой для разработки противовирусных препаратов, нацеленных как на SARS-CoV, так и на SARS-CoV-2.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-14-00130). Эксперименты были выполнены с использованием оборудования Центра коллективного пользования ИБГ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clercq E.D., Li G. // Clin Microbiol Rev. 2016. V. 29. P. 695–747.
2. Gebauer M., Skerra A. // Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2020. V. 60. P. 391–415.
3. Surjit M., Lal S.K. // Infect Genet Evol. 2008. V. 8. P. 397–405.
4. Wu C., Zheng, M. // Preprints. 2020. 2020020247.
5. Prajapat M., Sarma P., Shekhar N., et al. // Indian J Pharmacol. 2020. V. 52. P. 56.
6. Tilocca B., Soggiu A., Sanguinetti M., et al. // Microbes Infect. 2020. V. 22. P. 218–220.
7. Liao H.-I., Olson C.A., Hwang S., et al. // J Biol Chem. 2009. V. 284. P. 17512–17520.
8. Li G., Li W., Fang X., et al. // Protein Expr Purif. 2021. V. 186.
9. Weinken C., Baaske P., Rothbauer U., et al. // Nat Commun. 2010. V. 1, 100.
10. Du Y., Zhang T.H., Meng X., et al. // Preprint. 2020.

AMONG ANTIBODY-LIKE MOLECULES, MONOBODIES, ABLE TO INTERACT WITH NUCLEOCAPSID PROTEIN OF SARS-COV VIRUS, THERE ARE MONOBODIES WITH HIGH AFFINITY TO NUCLEOCAPSID PROTEIN OF SARS-COV-2 VIRUS

Y. V. Khrantsov^a, A. V. Ulasov^a, T. N. Lupanova^a, Academician of the RAS G. P. Georgiev^a, and Corresponding Member of the RAS A. S. Sobolev^{a,b,#}

^aInstitute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russian Federation

^bLomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: alsobolev@yandex.ru

Seven amino acid sequences of antibody-like molecules, monobodies, capable of interacting with the nucleocapsid protein of the SARS-CoV virus were taken from the literature. Nucleotide sequences of monobodies genes were obtained by gene synthesis, which were expressed in *E. coli* and isolated using Ni-NTA chromatography. It was shown by thermophoresis that three of the seven selected antibody-like molecules can interact with high affinity (dissociation constant of tens of nM) with the nucleocapsid protein of the SARS-CoV-2 virus. For the remaining four monobodies, only low affinity binding with a dissociation constant of several μ M was found.

Keywords: SARS-CoV, SARS-CoV-2, nucleocapsid protein, antibody-like molecules, monobody, thermophoresis