

УДК 577.2

МОДУЛЬНЫЕ НАНОТРАНСПОРТЕРЫ, СПОСОБНЫЕ СВЯЗЫВАТЬСЯ В КЛЕТКАХ-МИШЕНЯХ С НУКЛЕОКАПСИДНЫМ БЕЛКОМ ВИРУСА SARS-COV-2

© 2023 г. Ю. В. Храмцов¹, А. В. Уласов¹, Т. Н. Лупанова¹, академик РАН Г. П. Георгиев¹, член-корреспондент РАН А. С. Соболев^{1,2*}

Поступило 24.11.2022 г.
После доработки 29.12.2022 г.
Принято к публикации 29.12.2022 г.

На основании литературных данных была выбрана антителоподобная молекула, монободи, способная с высоким сродством (константа диссоциации 6.7 нМ) взаимодействовать с нуклеокапсидным белком (N-белком) вируса SARS-CoV-2. Для доставки различных молекул в выбранный компартмент клеток-мишеней нами ранее были разработаны модульные нанотранспортеры (МНТ). В данной работе методами генной инженерии в состав МНТ было включено монободи к N-белку вируса SARS-CoV-2. В данный МНТ также был введен сайт отщепления монободи от МНТ в эндосомах. Методом термофореза было показано, что отщепление данного монободи от МНТ эндосомной протеазой катепсином В приводит к увеличению сродства монободи к N-белку в 12 раз. Клеточным анализом теплового сдвига была показана способность полученного МНТ взаимодействовать с N-белком в клетках A431, трансфицированных N-белком вируса SARS-CoV-2, слитым с флуоресцентным белком mRuby3.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, модульные нанотранспортеры, нуклеокапсидный белок, антителоподобные молекулы, монободи, термофорез, клеточный анализ теплового сдвига

DOI: 10.31857/S2686738923700191, **EDN:** QHSOXH

Пандемия коронавируса SARS-CoV-2 убедительно продемонстрировала необходимость разработки новых противовирусных препаратов. Классические низкомолекулярные ингибиторы вирусной активности [1] можно подобрать не ко всем белковым мишеням, в то время, как для практически любого белкового антигена можно получить небольшие антителоподобные молекулы с высокой аффинностью [2]. Таким белком-мишенью может служить, например, нуклеокапсидный белок или N-белок вируса SARS-CoV-2, имеющий множество жизненно необходимых для данного вируса функций [3–5]. В работе [6] на основе десятого домена фибронектина 3 типа человека была получена антителоподобная молекула, монободи (NC2), к N-белку вируса SARS-CoV-2, имеющая константу диссоциации с N-белком, равную 6.7 нМ. Ранее для доставки нужной молекулы в заданный компартмент клеток-мишеней

нами были разработаны модульные нанотранспортеры (МНТ), содержащие ряд полипептидных модулей, позволяющих конструкции связываться с клеткой-мишенью, интернализироваться в нее и выходить из эндосом в гиалоплазму [7, 8]. Методами генной инженерии NC2 было включено в состав МНТ с добавлением сайта отщепления NC2 от МНТ в эндосомах. В работе изучалась способность свободного NC2 и NC2 в составе МНТ взаимодействовать с N-белком в растворе. Также изучалась способность полученного МНТ связываться с N-белком в клетках A431.

По опубликованной в [6] аминокислотной последовательности NC2 был осуществлен синтез гена монободи NC2 с получением слитого белка affibody(EGFR)-His tag-DTox-HMP-FKFL-NC2, где affibody(EGFR) – аффибоди к рецептору эпидермального фактора роста, DTox – транслокационный домен дифтерийного токсина, HMP – гемоглиноподобный белок *E. coli* и FKFL – сайт расщепления эндосомной протеазой катепсином В. Плазмиды, кодирующие N-белок SARS-CoV-2 с His-тагом и N-белок SARS-CoV-2, слитый с флуоресцентным белком mRuby3, были любезно предоставлены компанией ShineGene (Китай) и доктором Raphael Gaudin (Addgene

¹ Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

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

*e-mail: alsobolev@yandex.ru

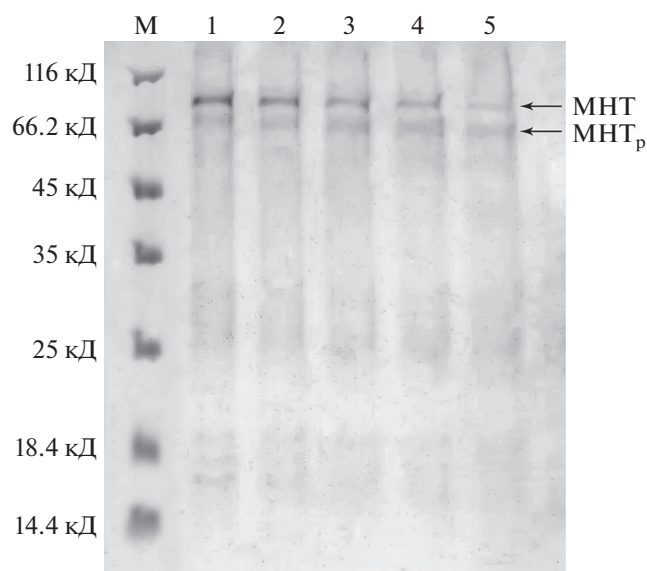


Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле. Образцы 1 – МНТ (700 нМ) без добавления катепсина В, 2–1 ч инкубации МНТ (700 нМ) с катепсином В (4 мкг/мл), 3–2 ч инкубации МНТ (700 нМ) с катепсином В (4 мкг/мл), 4–3 ч инкубации МНТ (700 нМ) с катепсином В (4 мкг/мл), 5–23 ч инкубации МНТ (700 нМ) с катепсином В (4 мкг/мл). М – белковые стандарты. МНТ – исходный МНТ, МНТ_р – расщепленный вариант МНТ.

plasmid # 170466) соответственно. Экспрессию МНТ и N-белка проводили в штамме *E. coli* BL21(DE3). Индукцию экспрессии МНТ и N-белка проводили 500 мкМ IPTG в течение 18 ч при 17°C для МНТ и в течение 3 ч при 37°C для N-белка. МНТ выделяли из растворимой фракции [9], а N-белок – из нерастворимой фракции [10], а затем очищали аффинной хроматографией на носителе HisTrap High Performance (Cytiva). Полученные 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 86% для МНТ (рис. 1, образец 1)).

Для расщепления полученного МНТ (700 нМ) использовался катепсин В (Native human Cathepsin B protein (ab90387, Abcam)) в концентрации 4 мкг/мл. Перед применением катепсин В активировался, как описано в [11]. Расщепление МНТ проводилось при pH 5.5 с добавлением 0.001% SDS, чтобы избежать агрегации МНТ. По мере увеличения времени инкубации МНТ с катепсином В интенсивность полосы на полиакриламидном геле после электрофореза, отвечающей полноразмерному МНТ (83.5 кД), уменьшается, а МНТ с отщепленным NC2 (около 70 кД) – увеличивается (рис. 1). Рассчитанная по изменению интенсивности этих полос константа скорости

расщепления сайта FKFL в составе МНТ равна $0.31 \pm 0.03 \text{ ч}^{-1}$. Образец, где практически все NC2 отщепилось от МНТ, был получен при 23 ч инкубации МНТ с катепсином В (рис. 1, образец 5) и в дальнейшем рассматривался как свободное мономери NC2.

Взаимодействие МНТ и NC2 с N-белком изучали так же, как описано в [12], методом терморефа на приборе Monolith NT.115 Series (“Nano-Temper Technologies GmbH”, Германия) в буфере 10 мМ NaH₂PO₄, 150 мМ NaCl, pH 8.0. N-белок был помечен флуоресцентным красителем AF488, подобно тому, как это описано в [12] с той же степенью модификации. Клеточный анализ теплового сдвига проводили на клетках A431, временно трансформированных N-белком (3–4% трансфекция), слитым с флуоресцентным белком mRuby3, подобно тому, как описано в [12], с тем исключением, что кривые плавления N-белка получались не по флуоресценции образцов, а по данным Вестерн блота с антителами на N-белок (ab273167, Abcam). Интенсивность всех полос нормировалась на интенсивность полосы образца, который не подвергался нагреванию.

При фиксированной концентрации N-AF488 (10 нМ) методом терморефа были получены зависимости относительной флуоресценции (за 100% принята флуоресценция до начала терморефа) через 2.5 с после начала терморефа от концентрации МНТ (рис. 2а) или NC2 (рис. 2б). Для каждого эксперимента получали три-четыре таких зависимости, и весь эксперимент повторяли три-пять раз. По каждой кривой определяли константу диссоциации комплекса МНТ или NC2 с N-белком, ее усредняли по всем 8-16 кривым и определяли относительную ошибку ее измерения. Константы диссоциации комплексов МНТ или NC2 с N-белком составили 116 ± 20 и 10 ± 3 нМ соответственно. Для свободного NC2 это близко к литературным значениям данной константы – 6.7 нМ [6]. Таким образом, сродство к N-белку свободного NC2 на порядок выше, чем NC2 в составе МНТ.

Для изучения взаимодействия полученного МНТ с N-белком в клетке был использован клеточный анализ теплового сдвига (CETSA) [13]. Кривая плавления свободного N-белка (рис. 3, полые квадраты) была получена путем проведения CETSA на интактных клетках A431, временно трансформированных N-белком. Для получения кривой плавления N-белка в комплексе с МНТ (рис. 3, квадраты) клетки A431 сначала лизировались четырьмя циклами замораживания в жидком азоте-оттаивания при 37°C, к ним добавлялся избыток МНТ (1 мкМ), и затем проводился CETSA. В эксперименте по проверке связывания МНТ с N-белком в клетке МНТ инкубировался с клетками A431 30 и 60 мин, далее клетки отмывались

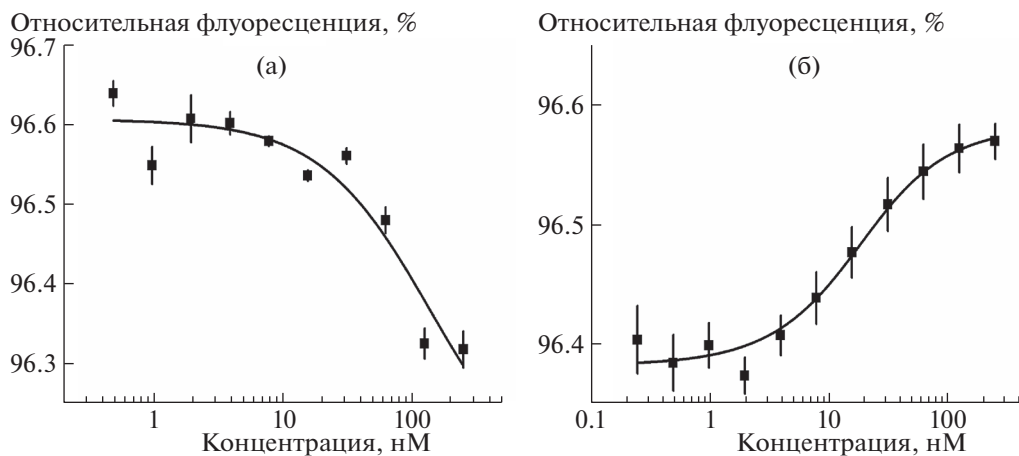


Рис. 2. Зависимости относительной интенсивности флуоресценции (за 100% принята интенсивность флуоресценции до начала термофореза) через 2.5 с после начала термофореза от концентрации МНТ (а) и МНТр (б) при постоянной концентрации N-белка (10 нМ). Указана среднеквадратичная ошибка определения относительной интенсивности флуоресценции (8–16 повторов).

раствором Версена, снимались с подложки 0.25% раствором Трипсина/Версена, центрифугировались и переводились в раствор Хенкса, а затем для этих образцов проводился метод CETSA. Кривые плавления N-белка для образцов с инкубацией 30 и 60 мин (рис. 3, кружки и треугольники) хорошо совпадают с кривой плавления для комплекса N-белка с МНТ. Это говорит о том, что МНТ не просто проникает в клетки-мишени, но и связывается большинством молекул N-белка в этих клетках.

Таким образом, был создан МНТ, в котором перспективное моноклоны NC2 к N-белку вируса SARS-CoV-2 потенциально может отщепляться в эндосомах протеазой катепсином В. Одним из основных плюсов такого отщепления является существенное уменьшение константы диссоциации комплекса N-белка со свободным NC2, по сравнению с NC2 в составе МНТ (с 116 ± 20 нМ до 10 ± 3 нМ), что должно способствовать лучшему связыванию NC2 с N-белком в клетке-мишени. С помощью CETSA было показано, что уже через 30 мин инкубации клеток A431 с МНТ, последний может проникать в эти клетки и связываться с N-белком, которым были трансфицированы данные клетки. Конкурентное взаимодействие с N-белком потенциально способно нарушить весь процесс сборки новых вирусных частиц [14], а значит подавить распространение вируса в организме. Не смотря на то что полученный МНТ потенциально может расщепляться в эндосомах, не известна кинетика этого процесса. Поэтому в дальнейшем нами предполагается изучить, связывается ли с N-белком полноразмерный МНТ или моноклоны, отщепленное от данного МНТ.

В результате проведенной работы нами был получен МНТ, содержащий моноклоны NC2 к N-белку вируса SARS-CoV-2, с возможностью отщепления данного моноклоны в эндосомах. Показано, что средство к N-белку отщепленного от МНТ NC2 на порядок выше, чем NC2 в составе МНТ. Продемонстрировано, что полученный МНТ способен связываться с N-белком в клетках A431. Полученная конструкция потенциально способна стать основой противовирусного препарата, нацеленного на SARS-CoV-2.

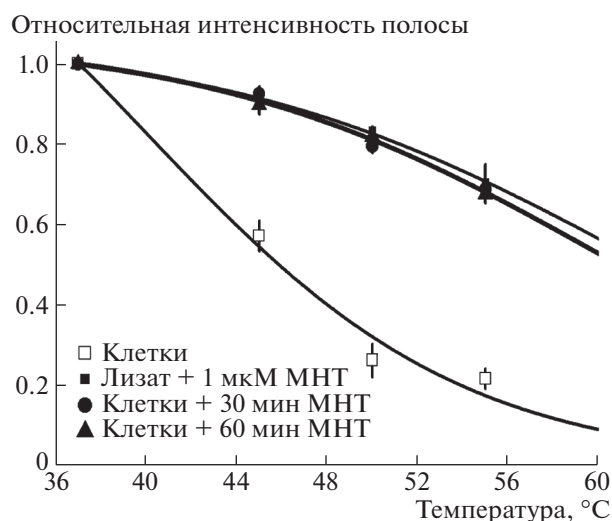


Рис. 3. Кривые плавления N белка коронавируса SARS-CoV-2, полученные в присутствии и в отсутствие МНТ клеточным анализом теплового сдвига. Обсуждение дано в тексте. Указана среднеквадратичная ошибка определения относительной интенсивности полосы (8–9 повторов).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет грантов Российского научного фонда (проекты № 22-24-00035 и 21-14-00130). По проекту № 22-24-00035 выполнены все работы, связанные с отщеплением моноклонального антитела В, а по проекту № 21-14-00130 все остальные работы. 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. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>
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. Du Y., Zhang T., Meng X., et al. // *Preprints.* 2020.
7. Sobolev A.S. // *Front Pharmacol.* 2018. V. 9, 952.
8. Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Lupanova T.N., et al. // *Acta Cryst.* 2020. V. D76. P. 1270–1279.
9. Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Khramtsov Y.V., et al. // *Drug Des Devel Ther.* 2017. V. 11. P. 1315–1334.
10. Li G., Li W., Fang X., et al. // *Protein Expr Purif.* 2021. V. 186.
11. Kern H.B., Srinivasan S., Convertine A.J., et al. // *Mol Pharmaceutics.* 2017. V. 14 (5). P. 1450–1459.
12. Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Lupanova T.N. et al. // *Dokl Biochem Biophys.* 2022. V. 506. P. 220–222.
13. Molina D.M., Jafari R., Ignatushchenko M., et al. // *Science.* 2013. V. 341. P. 84–87.
14. Liao H.-I., Olson C.A., Hwang S., et al. // *J Biol Chem.* 2009. V. 284. P. 17512–17520.

MODULAR NANOTRANSPORTERS CAPABLE OF BINDING WITH SARS-COV-2 VIRUS NUCLEOCAPSID PROTEIN INTO TARGET CELLS

Y. V. Khramtsov^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,#}

^a Institute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

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

Based on the literature data, an antibody-like molecule, a monobody, was selected that is capable of interacting with the nucleocapsid protein (N-protein) of the SARS-CoV-2 virus with high affinity (dissociation constant 6.7 nM). We have previously developed modular nanotransporters (MNTs) to deliver various molecules to a selected compartment of target cells. In this work, a monobody to the N-protein of the SARS-CoV-2 virus was included in the MNT using genetic engineering methods. In this MNT, a site for the cleavage of the monobody from the MNT in endosomes was also introduced. It was shown by thermophoresis that the cleavage of this monobody from MNT by the endosomal protease cathepsin B leads to a 12-fold increase in the affinity of the monobody for the N-protein. Cellular thermal shift assay showed the ability of the obtained MNT to interact with the N-protein in A431 cells transfected with the SARS-CoV-2 N-protein fused to the mRuby3 fluorescent protein.

Keywords: SARS-CoV-2, modular nanotransporters, nucleocapsid protein, antibody-like molecules, monobody, thermophoresis, cellular thermal shift assay