

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 5-[4'-(N-МЕТИЛ-1,3-БЕНЗИМИДАЗОЛ-2-ИЛ)ФЕНИЛ]-10,15,20-ТРИ-(N-МЕТИЛ-3'-ПИРИДИЛ)ПОРФИРИНТРИИОДИДА С S-БЕЛКОМ SARS-CoV-2

© 2022 г. С. А. Сырбу^a, А. Н. Киселёв^{a,b}, М. А. Лебедев^{a,b}, Ю. А. Губарев^a,
Е. С. Юрина^{a,*}, Н. Ш. Лебедева^a

^a Институт химии растворов имени Г. А. Крестова Российской академии наук,
ул. Академическая 1, Иваново, 153045 Россия

^b Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, 153000 Россия

*e-mail: yurina_elen77@mail.ru

Поступило в редакцию 17 марта 2022 г.

После доработки 17 марта 2022 г.

Принято к печати 10 апреля 2022 г.

В статье приведены результаты экспериментальных исследований взаимодействия S-белка с моногетарилзамещенным порфирином, содержащим остаток бензимидазола. Выявлено, что S-белок образует высокоаффинные комплексы с указанным порфирином. Связывание порфирина S-белком SARS-CoV-2 протекает ступенчато. На первом этапе движущими силами комплексообразования являются электростатические взаимодействия между поверхностными отрицательно заряженными областями белка и катионными заместителями порфирина. На втором этапе происходит образование целевого комплекса S-белка с порфирином. Установлено, что введение 5-[4'-(N-метил-1,3-бензимидазол-2-ил)фенил]-10,15,20-три-(N-метил-3'-пиридил)порфирина трииодида в раствор комплекса S-белка с ангиотензинпревращающим ферментом приводит к замещению последнего на порфирин. Вытеснение ангиотензинпревращающего фермента из комплекса с S-белком 5-[4'-(N-метил-1,3-бензимидазол-2-ил)фенил]-10,15,20-три-(N-метил-3'-пиридил)порфиринтрииодидом является экспериментальным доказательством связывания порфирина в рецептор-связывающем домене S-белка.

Ключевые слова: спектроскопия, порфирины, шиповидный белок, вирус SARS-CoV-2, ингибирование, инактивация

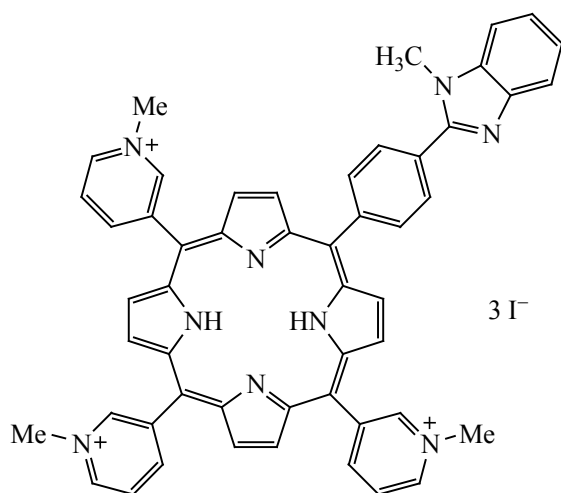
DOI: 10.31857/S0044460X22060129, **EDN:** CNMGHY

Новый коронавирус SARS-CoV-2, вызывающий заболевание COVID-19, оказал серьезное влияние на здоровье людей во всем мире. За последние несколько месяцев мы стали свидетелями появления вариантов SARS-CoV-2 с новыми мутациями S-белка, которые влияют на эпидемиологические и клинические аспекты пандемии COVID-19 [1–3]. Различные варианты мутаций вируса могут увеличивать скорость передачи вируса и/или повышать риск повторного заражения и снижать защиту, обеспечиваемую нейтрализующими моноклональ-

ными антителами и вакцинацией [4]. Спайковый белок SARS-CoV-2 обеспечивает связывание с ангиотензинпревращающим ферментом, расположенным на поверхности клеток хозяина (ACE2) и обеспечивает слияние мембран вируса и клетки.

Шиповидный белок также индуцирует реакцию нейтрализующих антител и поэтому является одной из основных мишеней для разработки лекарств и вакцин [5, 6]. Шиповидный белок, выступающий на поверхности вирусной частицы, состоит из трех идентичных цепей S-белка. Ка-

Схема 1.



ждая цепь состоит из двух субъединиц: S1 и S2. Субъединица S1 отвечает за связывание с рецептором, а S2 отвечает за слияние мембран [7] вируса и клетки хозяина. В состав субъединицы S1 входит N-концевой домен (NTD) и рецептор-связывающий домен (RBD) комплементарно связывающийся с рецептором ACE2 клетки хозяина. NTD — это самый внешний домен, который относительно более открыт и расположен с трех сторон, придавая белку треугольную форму. Исследования с помо-

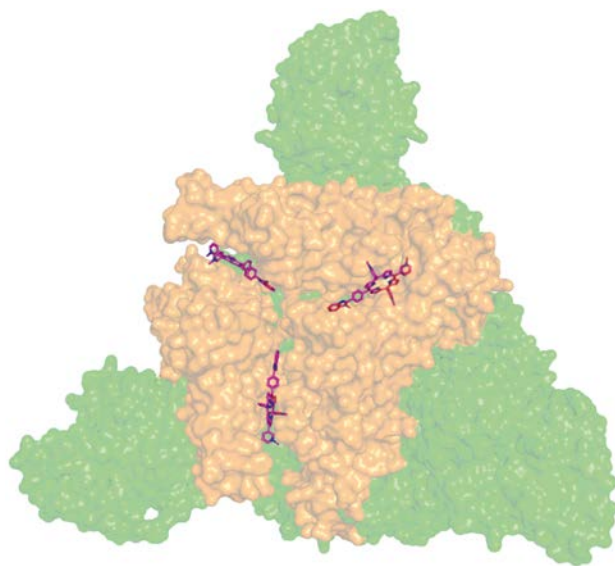


Рис. 1. Результаты молекулярного докинга N-prog с S-белком. Оранжевым выделен рецептор-связывающий домен.

щью криоэлектронной микроскопии показали [8], что NTD и RBD демонстрируют некоторую гибкость, но основная конформационная динамика находится между закрытой и открытой конформацией. Взаимодействие RBD с ACE2 вызывает сильное конформационное изменение в субъединице S2, затем с помощью ферментов хозяина (фурина и трансмембранной сериновой протеазы) происходит расщепление S-белка на субъединицы S1 и S2, что в конечном итоге приводит к слиянию оболочки вируса и клеточной мембраны хозяина с последующим высвобождением вирусного ядра в цитоплазму клетки [9–12].

Очевидно, что связывание препарата с S-белком может привести к ингибированию проникновения вируса в клетки, так как создаст конкуренцию связывания с ACE2 или не позволит осуществить конформационные изменения в S-белке для слияния мембран. Ранее в работе [13] с помощью молекулярного докинга был сконструирован и разработана методика синтеза 5-[4'-(N-метил-1,3-бензимидазол-2-ил)фенил]-10,15,20-три-(N-метил-3'-пиридил)порфиринтриодида (N-prog), молекулярная стыковка которого с S-белком SARS-CoV-2, показала наибольшую аффинность связывания. Целью данной работы являлось экспериментальное исследование процессов комплексообразования моногетарилзамещенного порфирина, содержащего остаток бензимидазола (схема 1) с S-белком и комплексом S-белка с ACE2.

Следует отметить, что по данным молекулярного докинга связывание порфирина осуществляется на поверхности RBD каждой цепи S-белка. При этом порфириновое соединение расположено между RBD областями двух соседних цепей, одновременно взаимодействуя с обеими аминокислотными последовательностями RBD (рис. 1) [13].

S-Белок – крупный белок коронавируса, его молекулярная масса составляет около 150 кДа, при этом на поверхности белка сравнительно много гидрофобных (незаряженных) участков полипептидной цепи [14, 15]. Поэтому концентрирование белка, необходимое для титрования им растворов порфириновых соединений, нежелательно. Высокие концентрации протеина могут вызывать его самоассоциацию. При титровании раствора порфирина концентрированным раствором белка,

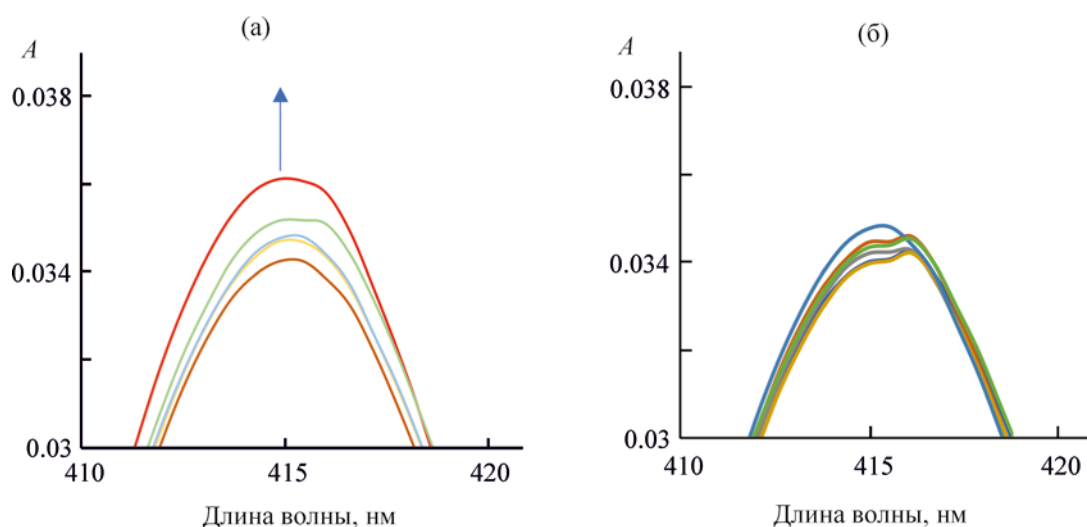


Рис. 2. Изменения в области полосы Сорс при титровании N-прог (2×10^{-7} моль/л) S-белком (3.98×10^{-6} моль/л) в PBS. Титрование до мольного соотношения белок:порфирин = 1:1.6 (а), 1:0.75 (б).

будет происходить разведение белка, что приводит к смещению долго устанавливающихся агрегационных равновесий. Это будет искажать результаты титрования порфирина белком. Однако при этом можно корректно оценить спектральное проявление взаимодействия порфирина с протеином. Поэтому на первом этапе было проведено титрование раствора порфирина S-белком.

Типичные спектральные изменения в ЭСП порфирина представлены на рис. 2. Как видно на начальном этапе титрования (до мольного соотношения белок:порфирин = 1:1.6, рис. 2а) при связывании с белком регистрируется увеличение оптической плотности растворов в области полосы Сорс порфирина. Мы связываем указанные изменения с быстрым поверхностным электростатическим взаимодействием катионного пор-

фирина с отрицательно заряженными участками поверхности белка. При дальнейшем титровании регистрируется расщепление полосы Сорс, появляется полоса поглощения, смещенная на 2–3 нм батохромно (рис. 2б). Это свидетельствует об изменении поляризации π -системы порфирина за счет изменения его сольватного окружения. Вероятно, именно эти изменения (рис. 2б) связаны с образованием целевого комплекса S-белка с моногетарилзамещенным порфирином. Косвенным подтверждением данного предположения является аналогичное батохромное смещение полосы Сорс порфирина при замене водного растворителя на ДМФА (табл. 1).

Количественные характеристики, отражающие аффинность S-белка к исследуемому порфиру были получены при спектрофотометрическом ти-

Таблица 1. Спектральные параметры N-прог в ДМФА и PBS

λ , нм	Площадь пика	FWHM	λ , нм	Площадь пика	FWHM
ДМФА			PBS		
419.6	38.3	17.5	414.3	29.2	19.3
512.6	9.4	48.3	513.7	2.1	26.9
546.9	4.6	26.7	535.8	0.6	26.7
586.8	7.6	45.6	578.7	0.8	27.5
639.7	4.9	29.8	636.3	0.3	29.8

Таблица 2. Параметры аффинности S-белка к N-рог

Система	Аффинность		Число сайтов связывания	
	ЭСП	флуоресцентная спектроскопия	ЭСП	флуоресцентная спектроскопия
S-белок–N-рог	2.4×10^6	5.94×10^5	1.7	3.6
	1.9×10^5	1.18×10^5	2.6	4.7
S-белок–ACE2–N-рог	2.23×10^5	1.56×10^5	0.9	2.2
	2.73×10^5	1.25×10^5	1.7	2.4

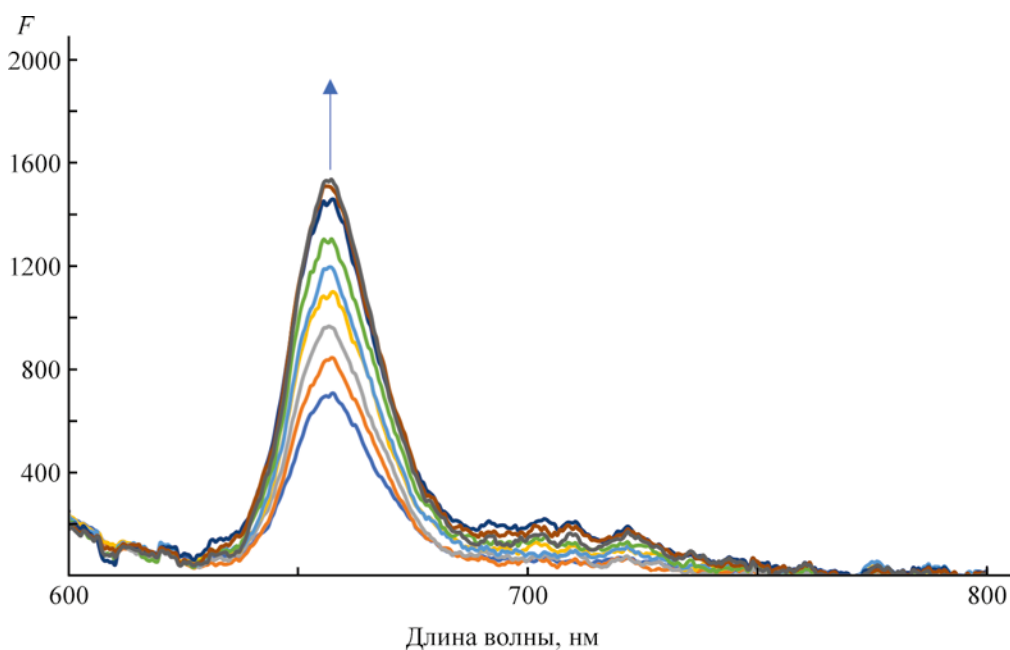
тровании S-белка (табл. 2). Концентрация S-белка в растворе не превышала 1.67×10^{-6} моль/л. Увеличение концентрации порфирина на каждом шаге титрования учитывалось вычитанием спектра порфирина в той же концентрации в чистом растворителе.

Флуоресцентную спектроскопию применяли для анализа взаимодействий порфирина-белок путем измерения изменения интенсивности излучения флуоресценции. Флуоресценция моногетарил-замещенного порфирина в составе комплексов с S-белком выше, чем в чистом растворителе рис. 3. Это может быть обусловлено вытеснением тушителей флуоресценции – иодид-ионов во внешнюю

координационную сферу при связывании порфирина в RBD сайте белка или смещении ассоциативных равновесий порфирина.

Последнее более вероятно, так как при прямом и обратном титровании наблюдали уменьшение светорассеивания, которое фиксировалось при регистрации спектров флуоресценции на длине волны накачки λ_{ex} 425 нм. Ассоциативные равновесия с участием порфиринов являются лабильными и поэтому не вносят существенной погрешности в вычисленные параметры аффинности (табл. 2).

Следующей экспериментальной задачей решаемой на данном этапе работы являлась оцен-

**Рис. 3.** Разностные спектры флуоресценции N-рог в растворе S-белка в PBS.

ка возможности вытеснения порфирином ACE2 из его комплекса с S-белком. Комплекс S-белка с ACE2 получали смешиванием компонентов в буферном растворе. Электронный спектр поглощения комплекса S-белка с ACE2 является малоинформативным, при введении в соответствующий раствор ACE2 помимо интенсивного поглощения S-белком с максимумом 237 нм наблюдается увеличение оптической плотности в области 282 нм, обусловленного наличием ACE2. Напротив, спектры флуоресценции комплекса S-белка с ACE2 существенно отличаются от спектров флуоресценции индивидуальных веществ. Комплекс S-белка с ACE2 демонстрирует широкий пик флуоресценции с максимумом при 338 нм. Исследуемый раствор комплекса S-белка с ACE2 был оптически прозрачен, спектры отражения на длине волны возбуждения (295 нм) типичны для не агрегированных белковых растворов.

Титрование комплекса S-белка с ACE2 N-рог вызывает существенные изменения в растворе. Уже на начальных этапах заместительного титрования фиксируется увеличение спектров отражения, что связано с вытеснением ACE2 из комплекса с S-белком. Параметры Скетчарда, отражающие аффинность N-рог к комплексу S-белка с ACE2 приведены в табл. 2. Также как и в случае связывания S-белка с N-рог график в координатах Скетчарда не линейен, выделяется два участка, что говорит о образовании двух типов комплексов в системе. Логично предположить, что, как и в случае образования комплекса N-рог–S-белок образование первичного комплекса связано с электростатическим взаимодействием. Аффинность N-рог к комплексу S-белок - ACE2 почти на порядок ниже, чем к S-белку, что вероятно связано с необходимостью замещения/вытеснения ACE2. Устойчивость комплекса N-рог с S-белком, полученного после вытеснения ACE2 почти в два раза выше, чем аналогичная характеристика, полученная для комплекса N-рог с индивидуальным S-белком. Указанные сведения говорят о предпочтительной реорганизации сайта связывания N-рог в S-белке, осуществляемой за счет разрушения комплекса S-белка с ACE2. Таким образом результаты заместительного титрования наглядно продемонстрировали, что введение в раствор комплекса S-белка с ACE2

N-рог приводит к разрушению комплекса S-белка с ангиотензинпревращающим ферментом. Конкурентное влияния N-рог и ACE2 за связывание с S-белком подтверждает, что связывание порфирина осуществляется именно в RBD сайте S-белка.

Таким образом, проведенное спектральное исследование взаимодействия S-белка с моногетарилзамещенным порфирином, содержащим остаток бензимидазола подтвердило, что S-белок образует высокоаффинные комплексы с изученным порфирином. Связывание порфирина S-белком протекает ступенчато, на первом этапе движущими силами комплексообразования являются электростатические взаимодействия между поверхностными отрицательно заряженными областями белка и катионными заместителями порфирина. Спектрально этот этап проявляется в увеличении оптической плотности растворов порфирина в области полосы Core. На втором этапе происходит образование комплекса порфирина с RBD S-белка (целевой комплекс). Спектрально образование целевого комплекса N-рог с S-белком проявляется в уменьшении оптической плотности и батохромном смещении полосы Core, а также увеличении флуоресценции порфирина.

Результаты заместительного титрования комплекса S-белка с ACE2 N-рог наглядно продемонстрировали, что N-рог приводит к разрушению комплекса S-белка с ангиотензинпревращающим ферментом. Конкурентное влияния N-рог и ACE2 за связывание с S-белком подтверждает, что связывание порфирина осуществляется именно в RBD сайте S-белка.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика синтеза и спектральные характеристики водорастворимого 5-[4'-(N-метил-1,3-бензимидазол-2-ил)фенил]-10,15,20-три-(N-метил-3'-пиридил)порфиринтриодида приведены в работе [16]. S-Белок (SARS-CoV-2) был экспрессирован, выделен и очищен в Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского. Молекулярная масса и аутентичность целевого белка подтверждена методами электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноблоттинга. Экспериментальные исследования проводили в растворе фосфатного буфера при pH 7.4. (PBS, Sigma).

Электронные спектры и спектры флуоресценции регистрировали на спектрофотометре AvaSpec-2048 (AvantesBV, Нидерланды) при 25°C в температурно- контролируемой ячейке. В качестве источника возбуждающего света при исследовании флуоресценции был использован монохроматический светодиод LEDUVTOP-295 (SensorElectronicTechnology, Inc. USA).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Сырбу Сергей Александрович, ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1482-2809>

Киселев Алексей Николаевич, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6664-6221>

Лебедев Михаил Александрович, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9318-3816>

Губарев Юрий Александрович, ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2870-2189>

Юрина Елена Сергеевна, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2403-7049>

Лебедева Наталья Шамильевна, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7260-3239>

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-60067)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harvey W.T., Carabelli A.M., Jackson B., Gupta R.K., Thomson E.C., Harrison E.M., Ludden C., Reeve R., Rambaut A., Peacock S.J., Robertson D.L. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2021. Vol. 19. P. 409. doi 10.1038/s41579-021-00573-0
2. Eggink D., Andeweg S.P., Vennema H., van Maarseveen N., Vermaas K., Vlaeynck B., Schepers R., van Gageldonk-Lafeber A.B., van den Hof S., Reusken C.B.E.M., Knol M.J. // medRxiv. 2021. doi 10.1101/2021.12.20.21268121
3. Rees-Spear C. Muir L., Griffith S.A., Heaney J., Aldon Y., Snitselaar J.L., Thomas P., Graham C., Seow J., Lee N., Rosa A., Roustan C., Houlihan C.F., Sanders R.W., Gupta R.K., Cherepanov P., Stauss H.J., Nastouli E., McCoy L.E. // *Cell Rep.* 2021. Vol. 34. N 12. P. 108890. doi 10.1016/j.celrep.2021.108890
4. Tao K., Tzou P.L., Nouhin J., Gupta R.K., de Oliveira T., Kosakovsky Pond S.L., Fera D., Shafer R.W. // *Nat. Rev. Genet.* 2021. Vol. 22. N 12. P. 757. doi 10.1038/s41576-021-00408-x
5. Wu C., Liu Y., Yang Y., Zhang P., Zhong W., Wang Y., Wang Q., Xu Y., Li M., Li X. // *Acta Pharm. Sin. (B)*. 2020. Vol. 10. N 5. P. 766. doi 10.1016/j.apsb.2020.02.008
6. Basu S., Holbrook L.T., Kudlaty K., Fasanmade O., Wu J., Burke A., Langworthy B.W., Farzal Z., Mamdani M., Bennett W.D. // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10. N 1. P. 1. doi 10.1038/s41598-020-66716-0
7. Liu Z., Xiao X., Wei X., Li J., Yang J., Tan H., Zhu J., Zhang Q., Wu J., Liu L. // *J. Med. Virol.* 2020. Vol. 92. N 6. P. 595. doi 10.1002/jmv.25726
8. Xiong X., Qu K., Ciazynska K.A., Hosmillo M., Carter A.P., Ebrahimi S., Ke Z., Scheres S.H., Bergamaschi L., Grice G.L., Zhang Y., Nathan J.A., Baker S., James L.C., Baxendale H.E., Goodfellow I., Doffinger R., Briggs J.A.G. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. Vol. 27. N 10. P. 934. doi 10.1038/s41594-020-0478-5
9. Rabi F.A., Al Zoubi M.S., Kasasbeh G.A., Salameh D.M., Al-Nasser A.D. // *Pathogens*. 2020. Vol. 9. N 3. P. 231. doi 10.3390/pathogens9030231
10. Bestle D., Heindl M.R., Limburg H., Pilgram O., Moulton H., Stein D.A., Hards K., Eickmann M., Dolnik O., Rohde C., Klenk H.-D., Garten W., Steinmetzer T., Böttcher-Friebertshäuser E. // *Life Sci. Alliance*. 2020. Vol. 3. N 9. P. e202000786. doi 10.26508/lsa.202000786
11. Sekimukai H., Iwata-Yoshikawa N., Fukushi S., Tani H., Kataoka M., Suzuki T., Hasegawa H., Niikura K., Arai K., Nagata N. // *Microbiol. Immunol.* 2020. Vol. 64. N 1. P. 33. doi 10.1111/1348-0421.12754
12. Shang J., Wan Y., Luo C., Ye G., Geng Q., Auerbach A., Li F. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2020. Vol. 117. N 21. P. 11727. doi 10.1073/pnas.2003138117
13. Gubarev Y.A., Lebedeva N.S., Yurina E.S., Syrбу S.A., Kiselev A.N., Lebedev M.A. // *J. Pharm. Anal.* 2021. Vol. 11. N 6. P. 691. doi 10.1016/j.jpha.2021.08.003
14. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D. // *Cell*. 2020. Vol. 181. N 2. P. 281. doi 10.1016/j.cell.2020.02.058
15. Yao H., Song Y., Chen Y., Wu N., Xu J., Sun C., Zhang J., Weng T., Zhang Z., Wu Z., Cheng L., Shi D., Lu X., Lei J., Crispin M., Shi Y., Li L., Li S. // *Cell*. 2020. Vol. 183. N 3. P. 730. doi 10.1016/j.cell.2020.09.018
16. Сырбу С.А., Киселев А.Н., Лебедев М.А., Губарев Ю.А., Юрина Е.С., Лебедева Н.Ш. // *ЖОХ*. 2021. Т. 91. № 6. С. 922; Syrбу S.A., Kiselev A.N., Lebedev M.A., Gubarev Y.A., Yurina E.S., Lebedeva N.S. // *Russ. J. Gen. Chem.* Vol. 91. N 6. P. 1039. doi 10.1134/S1070363221060098

Interaction of 5-[4'-(*N*-Methyl-1,3-benzimidazol-2-yl)phenyl]-10,15,20-tri-(*N*-methyl-3'-pyridyl)porphyrin Triiodide with SARS-CoV-2 S-Protein

S. A. Syrbu^a, A. N. Kiselev^{a,b}, M. A. Lebedev^{a,b}, Yu. A. Gubarev^a,
E. S. Yurina^{a,*}, and N. Sh. Lebedeva^a

^a*G.A. Krestov Institute of Solution Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Ivanovo, 153045 Russia*

^b*Ivanovo State University of Chemistry and Technology, Ivanovo, 153000 Russia*

e-mail: yurina_elen77@mail.ru

Received March 17, 2022; revised March 17, 2022; accepted April 10, 2022

This article shows the results of experimental studies of the interaction of the S-protein with a monohetaryl-substituted porphyrin containing a benzimidazole residue. It was revealed that the S-protein forms high-affinity complexes with the specified porphyrin. Porphyrin binding by the SARS-CoV-2 S-protein proceeds stepwise; at the first stage, the driving forces of complexation are electrostatic interactions between the surface negatively infected regions of the protein and cationic substituents of the porphyrin. At the second stage, the target complex of S-protein with porphyrin is formed. It has been established that the introduction of 5-[4'-(*N*-methyl-1,3-benzimidazol-2-yl)phenyl]-10,15,20-tri-(*N*-methyl-3'-pyridyl)porphyrin triiodide into a solution of the S-protein complex with angiotensin-converting enzyme leads to the replacement of the latter with porphyrin. Displacement of the angiotensin-converting enzyme from the complex with the S-protein 5-[4'-(*N*-methyl-1,3-benzimidazol-2-yl)phenyl]-10,15,20-tri-(*N*-methyl-3'-pyridyl)porphyrin triiodide is experimental evidence for porphyrin binding in the receptor-binding domain of the S-protein.

Keywords: porphyrins, spectroscopy, spike protein, SARS-CoV-2 virus, inhibition, inactivation