

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.1.12;578.088.

©Коллектив авторов

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИТОКЕРАТИНОВ ЧЕЛОВЕКА С АНАЛОГАМИ ИЗАТИНА

*О.А. Бунеева, О.В. Гнеденко, В.И. Федченко, А.С. Иванов, А.Е. Медведев**

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАМН, 119121, Москва, Погодинская ул. 10, эл. почта: Alexei.Medvedev@ibmc.msk.ru

При помощи оптического биосенсора Biacore 3000 исследовали взаимодействие рекомбинантных цитокератинов (СК) человека с аналогами изатина (5-аминокапроилизатином и 5-аминоизатином), иммобилизованными на CM5-чипе. СК14 эффективно взаимодействовал с 5-аминокапроилизатином, иммобилизованным на карбоксиметилдекстрановой поверхности чипа, но не с более “коротким” аналогом (5-аминоизатин). В отличие от СК14, СК8 эффективно взаимодействовал только с 5-аминоизатином. В обоих случаях связывание цитокератинов с иммобилизованными аналогами изатина характеризовалось довольно высоким сродством (K_d 0,7 мкМ для пары СК14/иммобилизованный 5-аминокапроилизатин и 1,7 мкМ для пары СК8/иммобилизованный 5-аминокапроилизатин). СК20 не взаимодействовал ни с одним из иммобилизованных аналогов изатина. С учетом ранее полученных данных о неспецифическом связывании СК14 мыши и СК8 крысы с 5-аминокапроил-сефарозой выполнен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей СК8 и СК14 человека, мыши и крысы. Полученные данные свидетельствуют о том, что в случае СК14 мыши, крысы и человека наиболее варибельным является N-концевой домен, а основные различия аминокислотной последовательности СК8 мыши, крысы и человека обнаружены как в N-концевой, так и C-концевой области.

Ключевые слова: изатин, аналоги изатина, изатин-связывающие белки, цитокератины, оптический биосенсор, белок-лигандные взаимодействия

ВВЕДЕНИЕ. Изатин – эндогенный биологический регулятор, обнаруженный в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях человека и животных [1-3]. В крови его концентрация может варьировать в диапазоне 0,1-1,3 мкМ [4-6], а в большинстве тканей – 0,1-3 мкМ [3]. В некоторых тканях (семявыносящий проток и пузырьки *vas deferens*, *seminal vesicles*) концентрация изатина, по-видимому, может достигать 40-70 мкМ. Изатин обладает широким спектром биологической и фармакологической активности (см. обзоры [1-3, 7], молекулярные механизмы которой нуждаются в детальном изучении. Неравномерное распределение самого изатина и изатин-связывающих белков в различных субклеточных фракциях и отделах центральной нервной системы [2, 3, 8-10] свидетельствует о важной, но все еще недостаточно изученной биологической роли этого соединения. Последнее особенно важно в связи с тем, что модифицированный разными заместителями изатин входит в состав широкого круга разрабатываемых в последнее время препаратов, в том числе ингибиторов апоптоза, антиконвульсантов, анксиолитиков, антибактериальных, противотуберкулезных и противогрибковых препаратов, а также противораковых средств [3, 7, 11].

Разнообразие биологических и фармакологических эффектов изатина и его аналогов, очевидно, связано с действием на различные биологические мишени. Недавно проведенная визуализация участков специфического связывания [3H]изатина *in situ* выявила существование изатин-связывающих структур

* - адресат для переписки

в различных отделах мозга крысы [10]. Кинетика связывания [^3H]изатина со срезами мозга крысы характеризовалась кривыми с насыщением и значениями K_d (0,2-0,3 мкМ), соответствующими физиологическим концентрациям [10]. Однако, в исследованных отделах мозга гомологичное ингибирование связывания [^3H]изатина увеличивающимися концентрациями “холодного” изатина носило сложный характер, что свидетельствовало о присутствии различных мишеней, проявляющих различное сродство к изатину.

С использованием 5-аминокапроилизатин-сефарозы в качестве аффинного сорбента и протеомных технологий (нано-ВЭЖХ и масс спектрометрии – ВЭЖХ/МС/МС) в гомогенате мозга крысы идентифицировано 25 индивидуальных изатин-связывающих белков [10]. Позднее, в результате улучшения процедуры пробоподготовки (путем этапа раздельной аффинной хроматографии растворимых и мембраносвязанных белков), в мозге мыши и крысы было идентифицировано 65 и 64 изатин-связывающих белка соответственно [12]. Связывание некоторых из этих белков с 5-аминокапроилизатином было подтверждено в прямых экспериментах с использованием оптического биосенсора Biacore 3000. Полученные значения K_d (0,1-46 мкМ) соответствовали диапазону величин K_d для связывания [^3H]изатина со срезами мозга крысы. Анализ изатин-связывающих белков мозга мыши и крысы выявил существенные межвидовые различия: хотя количество изатин-связывающих белков было практически одинаково (65 и 64), идентичными были менее трети белков (21) [12]. Так, в группе белков цитоскелета общие белки составляли 62% для мышей (8 из 13) и 42% для крыс (8 из 19). При этом только некоторые цитокератины крысы (но не мыши) связывались с аффинным сорбентом. Кроме того, анализ специфичности связывания белков мозга с 5-аминокапроилизатин сефарозой и сефарозой, не содержащей аффинного лиганда, выявил еще 14 белков цитоскелета крысы и 19 белков цитоскелета мыши, которые связывались с обоими сорбентами. Однако и в этом случае существовали определенные межвидовые отличия.

Цитокератины (СК) – структурные белки, участвующие в формировании промежуточных филаментов цитоскелета. В зависимости от молекулярной массы и изоэлектрической точки они разделены на два типа: тип I (включающий кислые цитокератины СК1-СК8 меньшей молекулярной массы) и тип II (основные цитокератины СК9-СК20 большей молекулярной массы). В структуре всех белков промежуточных филаментов, включая цитокератины, различают высококонсервативный альфа-спиральный центральный “палочковидный” домен и довольно неконсервативные N-концевой “головной” и C-концевой “хвостовой” домены [13, 14]. Аминокислотные последовательности суперсемейства белков промежуточных филаментов в начале и конце центрального палочкообразного домена характеризуются высокой гомологией [15].

Реорганизация белков цитоскелета в последнее время стала привлекать внимание в качестве потенциальной мишени действия не только изатина [10], но и других непептидных регуляторов (мелатонина [16]). Поэтому в настоящем исследовании, используя оптический биосенсор Biacore 3000, мы изучили возможность специфического взаимодействия трех доступных рекомбинантных цитокератинов человека: СК8, СК14 и СК20, – с аналогами изатина, иммобилизованными на оптическом чипе этого прибора. Ранее было обнаружено, что СК8 мозга мыши (но не крысы) и СК14 мозга крысы (но не мыши) связывались и с 5-аминокапроилизатин-сефарозой, и с сефарозой, не содержащей аффинного лиганда [12].

МЕТОДИКА. Рекомбинантные цитокератины СК8, СК14 и СК20 (с чистотой не менее 95%) приобретены у “Biomol GmbH” (Германия), реактивы и карбоксиметилдекстрановые чипы CM5 для оптического биосенсора Biacore 3000 (GE, США) - у фирмы “GE Healthcare” (США). Остальные реактивы аналитической чистоты были получены от “Sigma-Aldrich Rus” (Россия). Синтез 5-аминокапроилизатина и 5-аминоизатина был описан ранее [10, 17].

Эксперименты были выполнены на оптическом биосенсоре Biacore 3000, использующем эффект поверхностного плазмонного резонанса для регистрации межмолекулярных взаимодействий [18, 19]. В работе использовали стандартные оптические чипы CM5 с карбоксиметилдекстрановым покрытием. В различных каналах чипа иммобилизовали 5-аминоизатин и 5-аминокапроилизатин [12]. Инъекцию белков в концентрации 0,1-5 мкМ в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,4, осуществляли в течение 5 минут при скорости потока 5 мкл/мин. После каждого цикла регистрации межмолекулярных взаимодействий поверхность оптического чипа регенерировали с помощью инъекции 1 М NaCl в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,4, и 6 М гуанидинхлорида в течение 0,5 мин при скорости потока 50 мкл/мин. Кривые специфических взаимодействий белков с иммобилизованными на оптическом чипе лигандами получали в виде разности сигналов биосенсора между опытным и контрольным каналом. В качестве последнего был использован канал без иммобилизованного лиганда. Анализ сенсограмм и расчет констант диссоциации проводили, как описано ранее [12].

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей проводили с использованием программы Oxford Molecuла OMIGA 2.0 и программы NCBI/BLAST/blastp suite <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Введение 0,1-5,0 мкМ растворов рекомбинантных цитокератинов человека в канал биосенсора с иммобилизованным 5-аминокапроилизатином приводило к характерному росту сигнала только в случае СК14 (рис. 1). Его величина зависела от концентрации добавленного белка. Последующая промывка канала рабочим буфером сопровождалась быстрой диссоциацией молекулярных комплексов СК с иммобилизованным аминокaproильным аналогом изатина. Значение K_d составило $0,7 \pm 0,5$ мкМ.

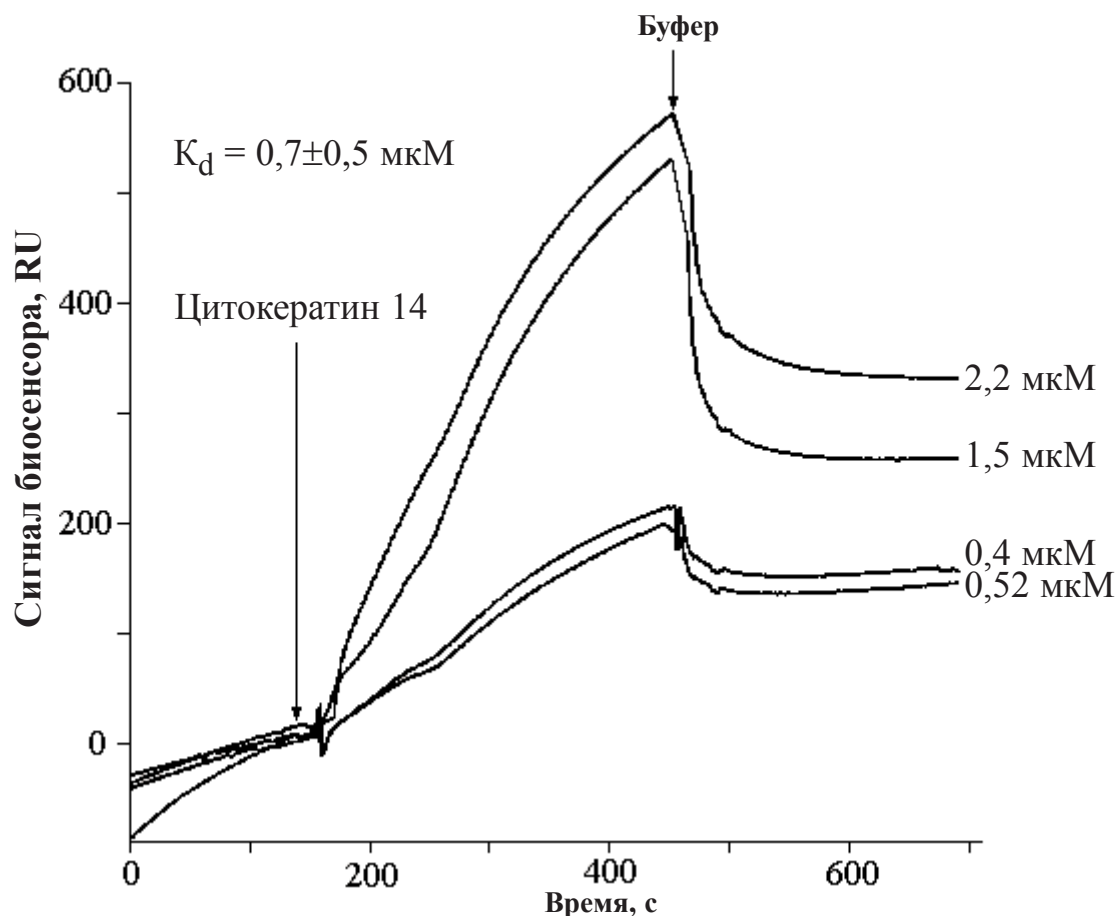


Рисунок 1.

Сенсограммы взаимодействия СК14 с иммобилизованным 5-аминокапроилизатином.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИТОКЕРАТИНОВ С АНАЛОГАМИ ИЗАТИНА

В отличие от СК14, эффективно взаимодействовавшего с 5-аминокапроилизатином, рекомбинантный СК8 человека эффективно взаимодействовал только с иммобилизованным 5-аминоизатином (рис. 2). Выраженность ответа биосенсора также зависела от количества внесенного белка. Значение K_d , в этом случае составляло $1,7 \pm 0,6$ мкМ.

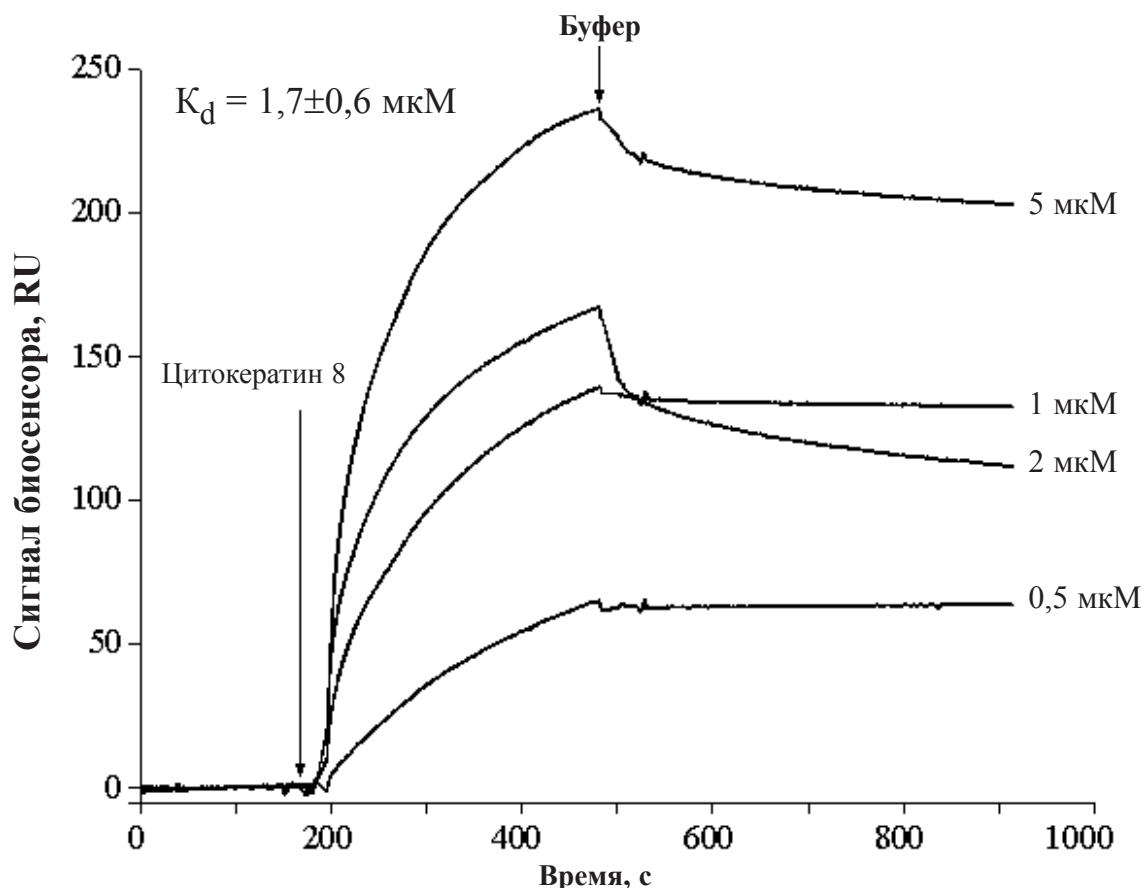


Рисунок 2.
Сенсограммы взаимодействия СК8 с иммобилизованным 5-аминоизатином.

В случае СК20 специфическое связывание не было обнаружено ни в одном из вариантов биосенсорного эксперимента (результаты не приведены).

Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что в отличие от цитокератинов мыши и крысы, цитокератины 8 и 14 человека могут избирательно взаимодействовать с разными структурными аналогами изатина. Поскольку структура многих цитокератинов характеризуется определенной консервативностью, представляло интерес сопоставить аминокислотные последовательности цитокератинов 8, 14 человека, крысы и мыши. По данным BLAST анализа, идентичность полных аминокислотных последовательностей составила 84% для СК14 и 88% для СК8. При этом в случае СК14 наиболее выраженные различия были обнаружены в N-концевом домене, особенно в области аминокислотных остатков (а.о.) 22-25, 49-54 и 76-95 (рис. 3). Основные различия аминокислотной последовательности СК8 человека, мыши и крысы были обнаружены в N-концевой (а.о. 45-47, 58-61) и С-концевой области (а.о. 446-450, 465-468) (рис. 4).

(a)

```
CK8 Hum  VGSSN—FRGGLGGYG—GASGMGGITAVIVNQSLISPLVLEV
CK8 Mouse VGSSSSSFRGSMGTGVGLGGFGGAGVGGITAVIVNQSLISPLKLEV
CK8 Rat   VGSSSSSFRGSLGGFGG—AG—VGGITAVIVNQSLINPLKLEV
Identity  ****  *** +*++ *  ++ + *****+*** **
```

(б)

```
CK8 Hum  LSYSIG—S SFGSGAGSSS FSRTSSSRAV
CK8 Mouse FSYGMSSFQP GFGSAGGSNT FSRT—TKAV
CK8 Rat   FSYGMSSFQP GFGSVGGSST YSRT—KAV
Identity  ***+  *** **+ +*** **
```

Рисунок 3.

Фрагменты выровненных аминокислотных последовательностей CK8 человека (Hum), мыши (Mouse) и крысы (Rat): (a) показаны N-концевые аминокислотные остатки 41-70, предшествующие центральному палочковидному домену, и (б) C-концевые аминокислотные остатки 441 по 460 "хвостового" домена.

```
CK14 Hum  GGGIGGGSSR ISSVLAGGSC RAPSTYGGGL SVSSSRFSSG
CK14 Mouse G—GGSSR MSSILAGGSC RAPSTYGG—M SVTSSRFSSG
CK14 Rat   G—GGSSR MSSVLAGGSC RAPSTYGG— —MSRFSSA
Identity  *  ***** **+***** ***** +++++*****+
```

```
CK14 Hum  GAYGLGGGYG GGFSSS— —SSSFG— —SGFGG
CK14 Mouse GACGIGGGYG GSFSSSSFGG GLGSGFGGRF —DGFGG
CK14 Rat   GAYAVGSGYG GGFSSSSFGG GFGGGIGGGI GGGGLGGGIGG
Identity  **++ *+*** *+***** + +* +**
```

Рисунок 4.

Фрагменты выровненных аминокислотных последовательностей CK14 человека (Hum), мыши (Mouse) и крысы (Rat). Показаны N-концевые аминокислотные остатки 21-100, предшествующие центральному палочковидному домену.

ОБСУЖДЕНИЕ. Недавно проведенное протеомное профилирование изатин-связывающих белков мозга мыши и крысы позволило идентифицировать более 60 белков, специфически взаимодействующих с аффинным сорбентом, 5-аминокапроилизатин-сефарозой [12]. Для ряда идентифицированных белков специфичность такого взаимодействия была экспериментально подтверждена с помощью оптического биосенсора Biacore 3000 путём прямой регистрации взаимодействий очищенных индивидуальных белков и аналогов изатина (5-аминокапроилизатин и 5-аминоизатин), иммобилизованных на CM5-чипе [12]. Однако, несмотря на количественное совпадение общего числа изатин-связывающих белков, идентифицированных в мозге крысы и мыши, идентичными были менее трети белков. Это свидетельствует о выраженных межвидовых различиях изатин-связывающих белков, которые, по-видимому, могут объяснить и различия во влиянии изатина на ряд параметров в экспериментах на крысах и мышках [12, 20, 21].

Белки цитоскелета составляют существенную часть идентифицированных изатин-связывающих белков (13 из 65 у мышей и 19 из 64 у крыс). Кроме того, некоторые цитокератины мыши (включая СК8, но не СК14) и крысы (СК14, но не СК8) были идентифицированы среди белков, связывающихся не только с 5-аминокапроилизатин-сефарозой, но и с контрольной сефарозой, не содержащей аффинного лиганда. Поэтому для оценки межвидовых различий изатин-связывающих белков было исследовано взаимодействие нескольких рекомбинантных цитокератинов человека СК8, СК14 и СК20.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что СК8 и СК14 человека специфически взаимодействуют с аналогами изатина, иммобилизованными на чипе оптического биосенсора Biacore 3000. Это взаимодействие зависит от длины линкерной вставки, соединяющей изатин с аминокгруппой, при помощи которой осуществляется ковалентная иммобилизация аналогов на декстрановой подложке биочипа: СК8 специфически связывался с 5-аминоизатином, а СК14 – с 5-аминокапроилизатином. СК20 не взаимодействовал ни с одним из использованных аналогов. Ранее нами было установлено, что среди идентифицированных изатин-связывающих белков глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) эффективнее взаимодействовала с 5-аминоизатином, чем с 5-аминокапроилизатином (K_d 2,8 и 25 мкМ соответственно); креатинкиназа демонстрировала более высокое сродство к 5-аминокапроилизатину, чем к 5-аминоизатину (K_d 0,08 и 0,29 мкМ соответственно); пероксиредоксин был несколько более специфичен к 5-аминоизатину, чем к 5-аминокапроилизатину (K_d 0,09 и 0,53 мкМ), а гликогенфосфорилаза демонстрировала одинаково невысокое сродство к обоим лигандам (K_d 30 и 46 мкМ) [12]. Сопоставляя эти данные с результатами настоящего исследования, следует отметить, что сродство СК14 человека к 5-аминокапроилизатину (а СК8 к 5-аминоизатину) находится в диапазоне физиологических концентраций изатина в тканях и биологических жидкостях человека и животных [3].

С учетом высокой видовой специфичности взаимодействия исследованных цитокератинов с аналогами изатина, представлялось целесообразным попытаться выявить различия первичной структуры этих белков. По нашим данным (рис. 3, 4), наиболее заметные межвидовые различия аминокислотной последовательности СК14 мыши, крысы и человека находятся в N-концевом домене (а.о. 22-25, 49-54 и 76-95). В случае СК8 различия аминокислотной последовательности СК8 мыши, крысы и человека обнаружены не только в N-концевой (а.о. 45-47, 58-61), но и в C-концевой области (а.о. 446-450, 465-468) этого белка.

В настоящее время неизвестно, какой из использованных аналогов лучше отражает взаимодействие идентифицированных белков с изатином. С одной стороны, исходно именно биосенсорный анализ с использованием 5-аминоизатина в качестве аффинного лиганда продемонстрировал существование изатин-связывающих белков при фракционировании гомогенатов мозга, сердца, печени и почек крысы [22]. С другой, при исследовании ГАФД были сопоставлены результаты биосенсорного анализа (с 5-аминоизатином в качестве аффинного лиганда) с данными радиолигандного анализа (с [3H]изатином) [23]. Оказалось, что значение K_d , рассчитанное по данным биосенсорного эксперимента как отношение k_{off}/k_{on} , было несколько выше (12 мкМ) величины K_d , полученной по данным радиолигандного анализа (3,1 мкМ). Тем не менее, мы полагаем, что результаты настоящей работы, включая анализ аминокислотной последовательности цитокератинов человека, мыши и крысы, служат важным инструментом на пути выяснения структурных особенностей изатин-связывающих белков.

Настоящие исследования осуществлены при финансовой поддержке РФФИ (проекты 06-04-48355, 09-04-00462).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Medvedev A.E., Clow A., Sandler M., Glover V.* (1996) *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 385–391.
2. *Medvedev A., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias M., Glover V.* (2005) *Stress*, **8**, 175–183.
3. *Medvedev A., Buneeva O., Glover V.* (2007) *Biologics*, **1**, 151–162.
4. *Manabe S., Gao Q., Yuan J., Takahashi T., Ueki A.* (1997) *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **691**, 197–202.
5. *Mawatari K., Segawa M., Masatsuka R., Hanawa Y., Iinuma F., Watanabe M.* (2001) *Analyst*, **126**, 33–36.
6. *Igosheva N., Matta S., Glover V.* (2004) *Physiol. Behav.*, **80**, 665–668.
7. *Pandeya S.N., Smitha S., Jyoti M., Sridhar S.K.* (2005) *Acta Pharm.*, **55**, 27–46.
8. *Crumeyrolle-Arias M., Medvedev A., Cardona A., Barritault D., Glover V.* (2003) *J. Neurochem.*, **84**, 618–620.
9. *Crumeyrolle-Arias M., Medvedev A., Cardona A., Tournaire M.-C., Glover V.* (2007) *J. Neural Transm.*, **72**, 29–34.
10. *Crumeyrolle-Arias M., Buneeva O., Zgoda V., Kopylov A., Cardona A., Tournaire M.-C., Pozdnev V., Glover V., Medvedev A.* (2009) *J. Neurosci. Res.*, **87**, 2763–2772.
11. *Vine K.L., Matesic L., Locke J.M., Ranson M., Skropeta D.* (2009) *Anticancer Agents Med. Chem.*, **9**, 397–414.
12. *Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., Glover V., Ivanov A., Medvedev A., Archakov A.* (2009) *Proteomics*, **9**, [Epub ahead of print 15 October 2009].
13. *Fuchs E., Weber K.* (1994) *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 345–382.
14. *Herrmann H., Aebi U.* (2004) *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 749–789.
15. *Ursitti J.A., Lee P.C., Resneck W.G., McNally M.M., Bowman A.L., O'Neill A., Stone M.R., Bloch R.J.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 41830–41838.
16. *Benitez-King G.* (2006) *J. Pineal Res.*, **4**, 1–9.
17. *Medvedev A.E., Goodwin B.L., Sandler M., Glover V.* (1999) *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 913–915.
18. *Myszka D.G.* (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8**, 50–57.
19. *Jönsson U., Föðgerstam L., Ivarsson B. et al.* (1991) *Biotechniques*, **11**, 620–627.
20. *Bhattacharya S.K., Mitra S.K., Acharya S.B.* (1991) *J. Psychopharmacol.*, **5**, 202–206.
21. *Abel E.L.* (1995) *Physiol. Behav.*, **57**, 611–613.
22. *Иванов Ю.Д., Панова Н.Г., Гнеденко О.В., Бунеева О.А., Медведев А.Е., Арчаков А.И.* (2002) *Вопр. мед. химии*, **48**, 73–83.
23. *Medvedev A.E., Buneeva O.A., Gnedenko O.V., Fedchenko V.I., Medvedeva M.V., Ivanov Yu.D., Glover V., Sandler M.* (2006) *J. Neural Transm. [Suppl]*, **71**, 195–203.

Поступила: 01. 09. 2009.

INTERACTION OF HUMAN CYTOKERATINS WITH ISATIN ANALOGUES

O.A. Buneeva, O.V. Gnedenko, V.I. Fedchenko, A.S. Ivanov, A.E. Medvedev

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya 10,
Moscow, 119121 Russia; e-mail: Alexei.Medvedev@ibmc.msk.ru

Using an optical biosensor Biacore 3000 the interaction of human recombinant cytokeratins (CK) with isatin analogues (5-aminocaproyl-isatin and 5-aminoisatin) immobilized on the CM-5 chip has been investigated. CK-14 effectively interacted with 5-aminocaproyl-isatin immobilized on the carboxymethyl dextran chip surface, but not with a "shorter" analogue (5-aminoisatin). In contrast to CK14 CK8 effectively interacted only with 5-aminoisatin. In both cases cytokeratin binding with the immobilized isatin analogues was characterized by rather high affinity (K_d of 0.7 μ M for the pair CK14/immobilized 5-aminocaproylisatin and 1.7 μ M for the pair CK8/immobilized 5-aminoisatin). CK20 did not interact with both immobilized isatin analogues. Taking into consideration non-specific binding of mouse CK14 and rat CK8 with 5-aminocaproyl-Sepharose we have performed comparative analysis of amino acid sequences of human, mouse, and rat CK8 and CK14. The data obtained suggest that in the case of human, mouse, and rat CK14 the N-terminal domain is the most variable among these species, whereas the major differences between amino acid sequences of human, mouse, and rat CK8 have been found both in N-terminal and C-terminal regions.

Key words: isatin, isatin analogues, isatin binding proteins, cytokeratins, optical biosensor, protein-ligand interactions.