

S. Kovtun-Vodyanitska, PhD, O. Vergun, PhD

M.M. Gryshko National Botanical Garden National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF THE ABOVE-GROUND PARTS INTRODUCTANTS OF THE GENUS *ISODON* (SCHRAD. EX BENTH.) SPACH

It was determined the total antioxidant activity above-ground parts of plants *Isodon japonicus* (Burman) H. Hara and *I. japonicus* (N. Z. Burm) Hara var. *glaucoalyx* (Maxim.) H. W. Li, introduced in M.M. Gryshko National Botanical Garden of NAS of Ukraine (Right-bank Forest-steppe). Used spectrophotometric method with an alcoholic solution of the radical DPPH. Samples of raw plant extracted with water, methanol and ethanol. The high antioxidant activity was obtained in methanol 82-83%. Phase development of plant did not has a cardinal effect on higher result. Installed the high antioxidant activity the species of genus *Isodon*, introduced in Ukraine. The obtained results allow us to consider them as a potential source of raw materials to creating products with the targeted antioxidant effect.

Key words: *introducents, Isodon, antioxidant activities, DPPH-*.

УДК 577.217.5

А. Малина, асп.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ,

О. Корнелюк, чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВЗАЄМОДІЯ ПРОТИПУХЛИННОГО ЦИТОКІНА ЕМАР II З ГІДРОКСИПРОПІЛ-В-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

Проведено дослідження зі взаємодії протипухлинного цитокіну ЕМАР II з гідроксипропіл-β-циклодекстрином методами оптичної спектроскопії. Встановлено, що ГПЦД специфічно зв'язується з ЕМАР II, причому найбільш вірогідним сайтом зв'язування є частково експонований залишок триптофану Trp126, локалізований в заглибині на поверхні ЕМАР II поряд з функціонально важливим лізин-багатим кластером.

Ключові слова: флуоресценція, гідроксипропіл-β-циклодекстрин, рекомбінантний цитокін ЕМАР II.

Вступ. Неправильний фолдінг і агрегація білків супроводжуються утворенням нерозчинних внутрішньоклітинних структур, що призводять до пошкодження і загибелі клітин. Дослідження механізму агрегації білків і механізмів, які запобігають їх агрегації, поряд з фундаментальним значенням має істотну практичну цінність для терапії так званих конформаційних (дегенеративних і нейродегенеративних) хвороб, зумовлених агрегацією білків. Індукувати агрегацію білків в клітинах можуть різні процеси. Перш за все це тепловий та окиснювальний стреси. *In vitro* нативні білки можуть бути розгорнуті в результаті теплової денатурації, а також під дією денатуруючих агентів, таких як гуанідінгідрохлорид або сечовина [3; 6]. Розгорнуті білки можуть взаємодіяти між собою, в основному за участю контактів гідрофобних поверхонь, з утворенням амілоїдних або аморфних агрегатів [3; 6; 15]. У зв'язку з цим дослідження механізму агрегації білків і механізмів пригнічення їхньої агрегації агентами природного і штучного походження є одним із актуальних напрямів сучасної біології.

Дослідження кінетики теплової агрегації різних білків в широкому діапазоні температур і концентрацій з використанням методу динамічного світлорозсіювання показало, що початковою стадією процесу агрегації білків є стадія утворення стартових агрегатів [8; 10; 11]. Стартовий агрегат включає сотні молекул денатурованого білка. Подальша агрегація білка обумовлена злипанням стартових агрегатів і агрегатів більш високого порядку. Стадія зростання білкових агрегатів протікає в кінетичному режимі, при якому кожне зіткнення призводить до злипання білкових агрегатів (так званий режим diffusion-limited cluster-cluster aggregation, DLCA) [10; 11].

Для зниження агрегації білків використовують низькомолекулярні сполуки, такі як циклодекстрини (ЦД) та їхні похідні [2; 10; 13-15]. Здатність ЦД пригнічувати агрегацію білків пояснюється їх властивістю зв'язуватися з залишками ароматичних амінокислот в ненативних (частково розгорнутих) формах білків.

Дослідження впливу ЦД на теплову інактивацію, денатурацію і агрегацію білків має важливе значення для біотехнології (підвищення виходу розчинної форми нативного рекомбінантного білка з солюбілізованих тілець

включення) і медицини (збільшення терміну зберігання білків, які мають терапевтичне значення, таких як гормон росту та інсулін; створення систем цілеспрямованої доставки ліків).

Відомо, що АРСазі можуть приймати участь в регуляторних процесах в клітинах. Клонування і секвенування гена тирозил-тРНК синтетази ссавців виявило високу гомологію амінокислотної послідовності С-кінцевого некаталітичного модуля цього ферменту до цитокіну ЕМАР II (endothelial monocyte activating polypeptide II), яка складає більше 80% (52% ідентичності) [5; 16]. Цитокін ЕМАР II було відкрито при дослідженні факторів, які забезпечують підвищену чутливість мікроциркуляторного русла деяких пухлин до фактору некрозу пухлин (TNF). Подальші дослідження ЕМАР II показали, що він має протипухлинну і протизапальну активність, бере участь в ангіогенезі, ембріогенезі та деяких патологічних процесах, індукує апоптоз клітин ендотелію. Пізніше було встановлено, що білком-попередником цього цитокіну є AIMP1/p43 – один з білків мультиферментного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз вищих евкаріотів. Загальновідомо, що злоякісні пухлини займають друге місце серед причин смерті в економічно розвинутих країнах та третє – в країнах, що розвиваються. Дослідження процесів, які лежать в основі взаємодії злоякісних новоутворень з організмом-хазяїном, мають теоретичні підстави для розробки нових протипухлинних препаратів і підходів до лікування онкологічних захворювань.

Метою роботи було дослідження взаємодії протипухлинного цитокіну ЕМАР II з гідроксипропіл-β-циклодекстрином.

Матеріали і методи. Експресія, виділення і очистка рекомбінантного білка ЕМАР II з клітин *Escherichia coli*. Для експресії білка ЕМАР II було використано штам-продуцент, отриманий на основі реципієнта *E. coli* BL21(DE3)pLysE. Штам клітин трансформовано плазмідним вектором pET-30a-ЕМАР II, у якого під контролем промотора фага T7 міститься ген, який кодує синтез цільового білка ЕМАР II. Генетичним маркером плазмиди pET-30a є ген *kan*, який забезпечує стійкість трансформованих клітин до антибіотику канаміцину.

Експресію рекомбінантного білка ЕМАР II проводили на поживному середовищі LB з додаванням канаміцину до кінцевої концентрації 30 мкг/мл. Індукцію експресії рекомбінантного білка ЕМАР II з промотора lacUV5 здійснювали шляхом додавання до культурального середовища ізопропіл- β -тіогалактопіранозиду (ІПТГ) до кінцевої концентрації 1,25 мМ [1]. Очистку цільового рекомбінантного білка ЕМАР II проводили методом металхелатуючої хроматографії на колонці з Ni-NTA агарозою (Qiagen, USA).

Концентрацію очищеного білка визначали на спектрофотометрі BioMate-5 з урахуванням коефіцієнту молярної екстинкції на довжині хвилі 280 нм, який складав $8730 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Коефіцієнт молярної екстинкції визначали за даними амінокислотного складу з використанням програми ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). Аналіз отриманого препарату проводили за допомогою SDS-гель-електрофорезу за Лемлі в денатуруючих умовах, використовуючи 15% розділюючий поліакриламідний гель із 0,1% додецилсульфату натрію.

Розчин трипептиду гліцин-триптофан-гліцин (Serva) готували у буфері 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl з pH 7,5. Концентрацію цього трипептиду визначали на спектрофотометрі BioMate-5 з урахуванням коефіцієнту молярної екстинкції на довжині хвилі 280 нм, що складав $5690 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

Методика флуоресцентних вимірювань. Для дослідження взаємодії рекомбінантного білка ЕМАР II і гідроксипропіл- β -циклодекстрину проводили титрування у буфері, який містив 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl з pH 7,5. Гідроксипропіл- β -циклодекстрин (ГПЦД) (Ashar) розчиняли у аліквоті білка (в тому ж буфері) та протягом 2 год інтенсивно перемішували при кімнатній температурі. Для дослідження взаємодії трипептиду та ГПЦД вико-

ристовували аналогічні умови, розчиняючи ГПЦД у розчині трипептиду. Це дозволяє уникнути впливу розведення білка і трипептиду на показники флуоресценції. Спектри флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі Hitachi M850 (Японія), який був обладнаний термостатованим кюветотримачем. Вимірювання проводили у кварcovій кюветі з довжиною оптичного шляху 0,5 см. Спектральна ширина щілин для монохроматора збуджувачого світла та реєструючої системи становила 5–10 нм. Довжина хвилі збудження дорівнювала 280 нм, інтервал довжини хвиль для спектрів флуоресценції становив 300–400 нм, реєстрацію флуоресценції проводили під кутом 90° до напрямку пучка збуджувачого світла при $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Молекулярний докінг проводили за допомогою онлайн сервісу HexServer (<http://hexserver.loria.fr/>). Координатний файл цитокіну ЕМАР II – 1E7Z.pdb, кореляційний тип – форма, розрахунковий прилад – GPU. Результати візуалізували за допомогою програми PyMol. Аналіз експонованості амінокислотних залишків проводили за допомогою онлайн сервісу GetArea (<http://curie.utmb.edu/getarea.html>) з радіусом 0,14 нм.

Результати та їх обговорення. З літературних джерел відомо, що всі циклодекстрини в першу чергу зв'язуються з ароматичними амінокислотними залишками, тому було проведено модельне дослідження взаємодії трипептиду гліцин-триптофан-гліцин з гідроксипропіл- β -циклодекстрином. Як видно з рис. 1 під час титрування трипептиду розчином ГПЦД спостерігається зростання інтенсивності флуоресценції трипептиду, що може свідчити про міцне зв'язування ліганда з гліцин-триптофан-гліцином. Про це також свідчить константа зв'язування, яка дорівнювала $9,84 \pm 0,80 \text{ mM}$. Стехіометрія зв'язування ліганда 1:1.

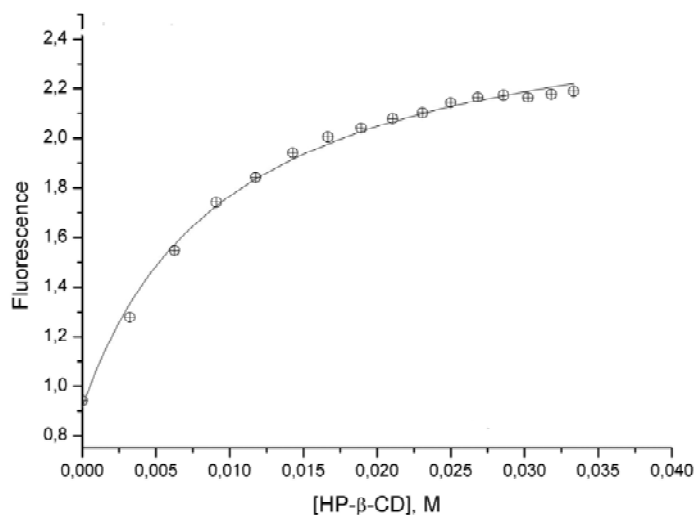


Рис. 1. Залежність інтенсивності флуоресценції трипептиду гліцин-триптофан-гліцин від концентрації гідроксипропіл- β -циклодекстрину в розчині. Буфер 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl, pH 7,5, температура 25°C ; λ_{EX} 280 нм, λ_{EM} 355 нм

При дослідженні взаємодії протипухлинного цитокіну ЕМАР II з гідроксипропіл- β -циклодекстрином інтенсивність флуоресценції ЕМАР II зростає у 2,1 рази (рис. 2),

що свідчить про міцне зв'язування, а константа зв'язування ліганда з ЕМАР II дорівнювала $5,12 \pm 0,74 \text{ mM}$.

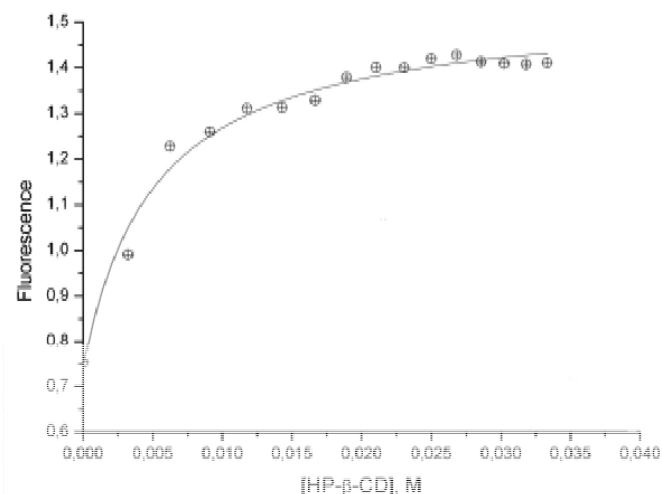


Рис. 2. Залежність інтенсивності флуоресценції протипухлинного цитокіну ЕМАР II від концентрації гідроксипропіл- β -циклодекстрину в розчині. Буфер 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl, рН 7,5, температура 25°C; λ_{EX} 280нм, λ_{EM} 334 нм

Проведено аналіз експонованості ароматичних амінокислотних залишків в структурі рекомбінантного цитокіну ЕМАР ІІ. Відомо, що ЕМАР ІІ має у своєму складі шість ароматичних амінокислот: Tyr32, Phe110, Tyr145, Phe113, Phe150 і Trp126. Найбільш експонованим є залишок Trp126 (18,6%), який знаходиться біля функціонального центру протейну (рис. 3). Як було згадано вище, циклодекстрини в першу чергу зв'язуються з ароматичними амінокислотами, тому, найбільш вигідним місцем зв'язування ГПЦД з протипу-

хлинним цитокином ЕМАР II буде саме цей триптофановий залишок (Trp126).

Для кращого розуміння взаємодії ГПЦД з ароматичними амінокислотами, було проведено молекулярний докінг трипептиду гліцин-триптофан-гліцин з гідроксипропіл- β -циклодекстрином за допомогою онлайн сервісу HexServer. З рис.4 видно, що взаємодія трипептиду з гідроксипропіл- β -циклодекстрином відбувається шляхом утворення зв'язку між триптофановим залишком та внутрішньою гідрофобною порожниною ліганду.

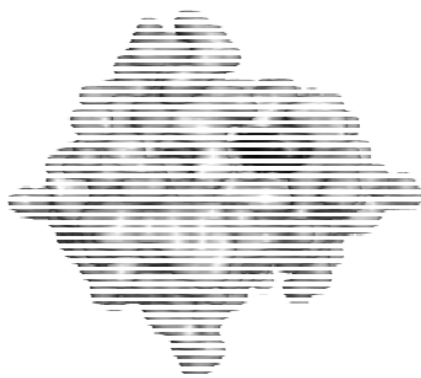


Рис. 3. Експонованість ароматичного залишку триптофану Trp126
на молекулярній поверхні рекомбінантного цитокіну ЕМАР II. Чорним кольором позначено Trp126 (координатний файл 1E7Z.pdb).
Структуру візуалізовано за допомогою програми PyMol

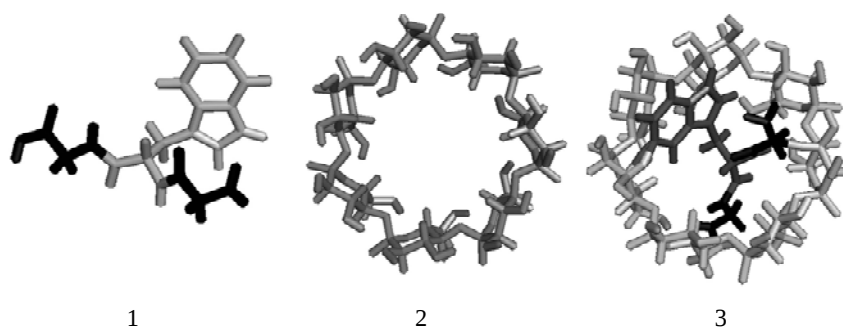


Рис. 4. Взаємодія трипептиду гліцин-триптофан-гліцин з гідроксипропіл- β циклодекстрином.
Тривимірні структури: 1 – трипептид гліцин-триптофан-гліцин; 2 – ГПЦД;
3 – можлива модель утворення комплексу трипептиду з ГПЦД

Проведений молекулярний докінг дозволяє зробити висновки про те, як саме відбувається взаємодія ароматичного амінокислотного залишку в складі трипептиду з ГПЦД.

Висновки. Встановлено, що ГПЦД специфічно зв'язується з ЕМАР II, причому найбільш вірогідним сайтом зв'язування є частково експонований залишок Trp126, локалізований в заглибині на поверхні ЕМАР II поруч з функціонально важливим лізин-багатим кластером.

Подяки. Висловлюємо подяку Драгану Анатолію Івановичу за допомогу в обговоренні результатів.

Робота виконана в рамках наукового проекту "Фундаментальні основи технології отримання нового протипухлинного цитокіна ЕМАР II та його мутантних форм з підвищеною антиангіогенною дією" цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України

Список використаних джерел

1. Бабенко Л. А. Оптимізація бактеріальної експресії проти пухлинного цитокіна ЕМАР II в клітинах *Escherichia Coli* BL21(DE3)pLysE / Л. А. Бабенко, О. Ю. Скоробогатов, О. Л. Дубровський, О. І. Корнелюк // *Мікробіологія і біотехнологія* – № 3. – 2010. – С. 21-31.
2. Курганов Б. И. Кинетика агрегации белков. Количественная оценка шаперонной активности в тестах, основанных на подавлении агрегации белков / Б. И. Курганов // *Биохимия*. – 2002. – № 67. С. 492–507.
3. Маркосян К. А. Фолдинг, неправильный фолдинг и агрегация белков. Образование телец включения и агресом / К. А. Маркосян, Б. И. Курганов // *Биохимия*. – 2004. – № 69. – С. 1196–1212.
4. Панасенко О. О. Структура и свойства малых белков теплового шока / О. О. Панасенко, О. В. Ким, Н. Б. Гусев // *Успехи биол. химии*. – 2003. – № 43. – С. 59–98.
5. Резников А. Г. Аминоацил-tРНК-синтазы: новая перспектива иммуномодуляции, регенерации и противоопухолевой терапии. / А. Г. Резников, А. И. Корнелюк // *Вісн. фармакології та фармації*. – 2008. – №9. – С. 2–9.

А. Малина, асп.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина,

А. Корнелюк, чл.-кор. НАН Украины, д-р биол. наук, проф.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЦИТОКИНА ЕМАР II С ГИДРОКСИПРОПИЛ-β-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

Проведенно дослідження взаємодії протипухлинного цитокіна ЕМАР II з гідроксипропіл-β-циклодекстрином методами оптичної спектроскопії. Встановлено, що ГПЦД специфічно зв'язується з ЕМАР II, причому найбільш вірогідним сайтом зв'язування є частково експонований залишок триптофана Trp126, локалізований в заглибині на поверхні ЕМАР II поруч з функціонально важливим лізин-багатим кластером.

Ключевые слова: флуоресценция, гидроксипропил-бета-циклодекстрин, рекомбинантный цитокина ЕМАР II.

A. Malyna, PhD stud.

Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU, Kyiv, Ukraine,

O. Kornelyuk, professor, Dr. Sci., Corresponding Member of NASU

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

INTERACTION OF ANTITUMOR CYTOKINE EMAP II WITH HYDROXYPROPYL-β-CYCLODEXTRIN

The interaction of the antitumor cytokine EMAP II with hydroxypropyl-β-cyclodextrin was investigated by methods of optical spectroscopy. Established that HP-β-CD binds specifically to EMAP II. The most likely binding site is partially exposed residue Trp126, localized in depressions on the surface of EMAP II along with functionally important lysine-rich cluster.

Keywords: fluorescence, hydroxypropyl-β-cyclodextrin, recombinant cytokine EMAP II.

6. Fink A. L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid / A. L. Fink // *Folding Dis.* – 1998. – № 3. – P. R9 – R23.

7. Giese K. C. Changes in oligomerization are essential for the chaperone activity of a small heat shock protein in vivo and in vitro / K. C. Giese, E. Vierling // *J. Biol. Chem.* – 2002. – № 277. – P. 46310–46318.

8. Golub N. Evidence of the formation of start aggregates as an initial stage of protein aggregation / N. Golub, A. Meremyanin, K. Markossian, T. Eronina [et al.] // *FEBS Lett.* – 2007. – № 581. – P. 4223–4227.

9. Hamada F. effect of dansyl-modified β-cyclodextrin on the chaperone activity of heat shock proteins / F. Hamada, M. Narita, A. Makabe, H. Itoh // *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* – 2001. – № 40. – P. 83–88.

10. Khanova H. A., Mechanism of chaperone-like activity. Suppression of thermal aggregation of betaL-crystallin by alpha-crystallin / H. A. Khanova, K. A. Markossian, B. I. Kurganov, A. M. Samoilov [et al.] // *Biochemistry.* – 2005. – № 44. – P. 15480–15487.

11. Markossian K. A. Mechanism of thermal aggregation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase / K. A. Markossian, H. A. Khanova, S. Y. Kleimenov, D. I. Levitsky [et al.] // *Biochemistry.* – 2006. – № 45. – P. 13375–13384.

12. Murphy R. M., Kendrick B.S. Protein Misfolding and Aggregation / R. M. Murphy, B. S. Kendrick // *Biotechnol. Prog.* – 2007. – № 23. – P. 548–52.

13. Nomura Y. Thermoresponsive controlled association of protein with a dynamic nanogel of hydrophobized polysaccharide and cyclodextrin: heat shock protein-like activity of artificial molecular chaperon / Y. Nomura, Y. Sasaki, M. Takagi, T. Narita [et al.] // *Biomacromolecules.* – 2005. – № 6. – P. 447–452.

14. Otzen D. E. Structural basis for cyclodextrins' suppression of human growth hormone aggregation / D. E. Otzen, B. R. Knudsen, F. Aachmann, K. L. Larsen [et al.] // *Protein Sci.* – 2002. – № 11. – P. 1779–1787.

15. Panyukov Y. The study of amorphous aggregation of tobacco mosaic virus coat protein by dynamic light scattering / Y. Panyukov, I. Yudin, V. Drachev [et al.] // *Biophys. Chem.* – 2007. – № 127. – P. 9–18.

16. Schwarz M. A. Endothelial-monocyte activating polypeptide II. A novel antitumor cytokine that suppresses primary and metastatic tumour growth and induces apoptosis in growing endothelial cells / M. A. Schwarz, J. Kandel, J. Brett [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1999. – № 190. – P. 341–354.

Надійшла до редколегії 16.03.15