

УДК 577.156; 577.151.64

ОПТИМИЗАЦИЯ РЕПОРТЕРА NEH2-LUC ДЛЯ СКРИНИНГА АКТИВАТОРОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ПРОГРАММЫ

А.Ю. Христиченко², Д.М. Хушпульян^{2,6}, Н.А. Смирнова³, А.А. Захарянц³,
Т.А. Чубарь^{1,3}, В.И. Тишков^{1,3,4*}, И.Г. Газарян^{1,3}, А.А. Полозников⁵

(¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; ²ООО «НТЦ Биоклиникум»; ³ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; ⁴Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ⁵Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; ⁶Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», факультет биологии и биотехнологии; *e-mail: vitishkov@gmail.com)

Получены репортерные конструкции, экспрессирующие слитые белки из фрагментов 16–96 и 16–85 а.о. Neh2-домена транскрипционного фактора Nrf2 и люциферазы светляков. Получены линии HeLa, стабильно экспрессирующие эти репортерные конструкции и ранее разработанную авторами конструкцию Neh2-luc. Проведен сравнительный анализ действия репортерных линий с помощью известного активатора Nrf2 (нордигидрогваяретовой кислоты). Показано, что репортер, экспрессирующий слитый с люциферазой минимальный фрагмент Neh2-домена, содержащий 16–85 а.о., обладает в два раза более высокой амплитудой отклика, чем репортер Neh2-luc, и может быть рекомендован для высокопродуктивного скрининга активаторов Nrf2. Улучшенный отклик этого репортера может быть обусловлен убиквитинированием N-концевых лизинов (7, 10, 11) белка люциферазы, находящихся вблизи убиквитинируемой последовательности Neh2.

Ключевые слова: Nrf2, Keap1, люцифераза, транскрипционный фактор, слитый белок, клеточный репортер, нордигидрогваяретовая кислота.

Список использованных в статье сокращений: NDGA – нордигидрогваяретовая кислота, DMSO – диметилсульфоксид, DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium, FBS – эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота, ПЦР – полимеразная цепная реакция, HRP – пероксидаза из корней хрена, PBS – изотонический фосфатный буфер.

В отсутствие воздействия на клетку ксенобиотиков прооксидантной или алкилирующей природы транскрипционный фактор Nrf2 [1–3], известный как основной регулятор антиоксидантной генетической программы, подвергается убиквитинированию и протеасомной деградации. Основной и наиболее изученный путь регуляции белковой стабильности Nrf2 осуществляется через его взаимодействие с димерным белком Keap1 [4–8], который представляет собой редокс-сенсор, входящий в убиквитинлигазный комплекс. Домен Nrf2, отвечающий за связывание с димером Keap1 (Neh2-домен), содержит два мотива связывания димера Keap1 с Kelch-доменом, имеющих высокую (остатки ETGE) и низкую (остатки DLG) аффинность. Они обеспечивают растягивание последовательности Neh2-домена (1–98 а.о.) между Kelch-доменами для последующего убиквитинирования лизинов внутри этой последовательности (рис. 1). Ранее на основе последовательности из остатков 1–97 фрагмента

Neh2-домена, слитого с люциферазой, нами был создан репортер Neh2-luc, позволяющий следить за внутриклеточной стабильностью этого домена в виде его слитого белка [9]. Созданный репортер был успешно использован для скрининга активаторов Nrf2 разной природы [9]. Количественная оценка действия репортера, проведенная недавно [10], показала, что уровень слитого белка в стационаре составляет около 60–80 нМ, это значение близко к константе связывания нативного Nrf2 с Keap1 (50 нМ). Таким образом, в микромолярном и субмикромолярном диапазоне репортер отбирает только очень сильные активаторы, например алкилирующие активаторы, работающие стехиометрически по механизму модификации тиолов Keap1, ответственных за формирование димера Keap1 или за его взаимодействие с убиквитинлигазой. Однако для отбора активаторов, действующих по механизму вытеснения Nrf2 из убиквитинлигазного комплекса, необходимо использовать на порядок более высокие concentra-

ствительностью по отношению к активаторам Nrf2 по сравнению с полноразмерным доменом Neh2. Последнее наблюдение исключительно важно, поскольку означает, что стабильную линию, экспрессирующую данный фрагмент, можно использовать для проведения сверхчувствительного высокопроизводительного скрининга активаторов Nrf2.

Результаты настоящей работы имеют также важное социальное значение, поскольку репортерная система на основе последовательности из остатков 1–97 Neh2-домена, слитого с лю-

циферазой, защищена патентом [12] и для ее использования при поиске активаторов Nrf2 необходимо получение разрешения патентообладателя или заключение соответствующего соглашения. Разработанная нами система не запатентована и может быть использована в научных исследованиях и практических разработках без ограничений.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-00921).

Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Itoh K., Chiba T., Takahashi S., Ishii T., Igarashi K., Katoh Y., Oyake T., Hayashi N., Satoh K., Hatayama I., Yamamoto M., Nabeshima Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. Vol. 236. P. 313.
2. Nguyen T., Huang H.C., Pickett C.B. // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 15466.
3. Nguyen T., Sherratt P.J., Nioi P., Yang C.S., Pickett C.B. // *J. Biol. Chem.* 2005. 280. P. 32485.
4. Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Ishii T., Igarashi K., Engel J.D., Yamamoto M. // *Genes Dev.* 1999. Vol. 13. P. 76.
5. Cullinan S.B., Gordan J.D., Jin J., Harper J.W., Diehl J.A. // *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24. P. 8477.
6. Zhang D.D., Lo S.C., Cross J.V., Templeton D.J., Hannink M. // *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24. P. 10941.
7. Zhang D.D. // *Drug Metab. Rev.* 2006. Vol. 38. P. 769.
8. Gazaryan I.G., Thomas B. // *Neural. Regen. Res.* 2016. Vol. 11. P. 1708.
9. Smirnova N.A., Haskew-Layton R.E., Basso M., Hushpulan D.M., Payappilly J.B., Speer R.E., Ahn Y.H., Rakhman I., Cole P.A., Pinto J.T., Ratan R.R., Gazaryan I.G. // *Chem. Biol.* 2011. Vol. 18. P. 752.
10. Khristichenko A.Yu., Poloznikov A.A., Hushpulan D.M., Smirnova N.A., Zakhariants A.A., Kazakov S.V., Tishkov V.I., Gazaryan I.G. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2019. Vol. 74. N 4. P. 180.
11. Ogura T., Tong K.I., Mio K., Maruyama Y., Kurokawa H., Sato C., Yamamoto M. // *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. Vol. 107. N 7. P. 2842.
12. Ratan R., Gazaryan I., Smirnova N.A. / Reporter system for high throughput screening of compounds and uses thereof // US Patent 9200046, priority June 29, 2012.

Поступила в редакцию 10.01.2020

Получена после доработки 12.01.2020

Принята к публикации 20.01.2020

OPTIMIZATION OF NEH2-LUC REPORTER FOR SCREENING OF ACTIVATORS OF ANTIOXIDANT PROGRAM

A.Yu. Khristichenko², D.M. Hushpulan^{2,6}, N.A. Smirnova³, A.A. Zakhariants³, T.A. Chubar^{1,3}, V.I. Tishkov^{1,3,4*}, I.G. Gazaryan^{1,3}, A.A. Poloznikov⁵

(¹ M.V. Lomonosov Moscow State University; ² Bioclinikum Ltd, Moscow; ³ Innovations and High Technologies MSU Ltd, Moscow; ⁴ A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow; ⁵ P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Center, National Medical Research Radiological Center, Moscow; ⁶ Faculty of Biology and Biotechnology, National Research University Higher School of Economics, Moscow; *e-mail: vitishkov@gmail.com)

Reporter vectors expressing amino acid residues 16–96 and 16–85 from Neh2-domain of Nrf2 transcription factor fused to firefly luciferase have been constructed. Cell lines stably expressing the above reporter constructs as well as an earlier developed Neh2-luc fusion reporter have been generated using HeLa cells. Comparative analysis of all three reporter lines has been performed using a well-known Nrf2 activator, nordihydroguaiaretic acid. The reporter expressing the minimal fragment of Neh2-domain containing 16–85 aa sequence exhibits a 2-fold higher amplitude of activation compared to Neh2-luc reporter, and thus can be recommended for high throughput screening for Nrf2 activators. A likely reason for the improved response of the above reporter could be ubiquitination of N-terminal lysine residues (7, 10, 11) of luciferase protein adjacent to the ubiquitinated Neh2 sequence.