

УДК 577.156; 577.151.64

ОПТИМИЗАЦИЯ РЕПОРТЕРА NEN2-LUC ДЛЯ СКРИНИНГА АКТИВАТОРОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ПРОГРАММЫ

А.Ю. Христинченко², 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-

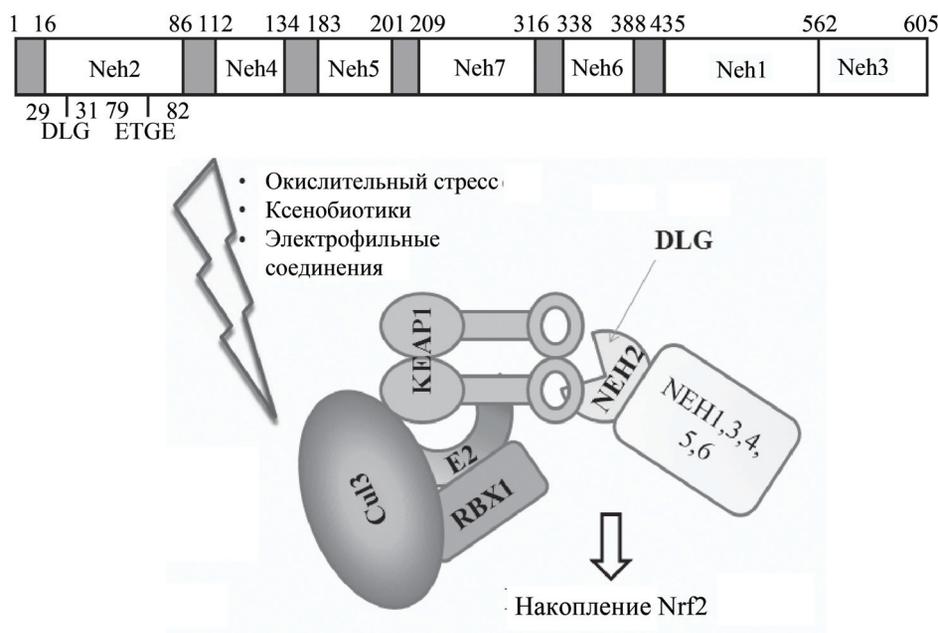


Рис. 1. Доменная структура (вверху) и механизм регуляции стабильности (внизу) белка Nrf2. Окисление тиолов димерной формы Keap1 приводит к разрушению убиквитинлигазного комплекса и стабилизации белка Nrf2

ции (более 50 мкМ) для успешной конкуренции активатора за Keap1 со слитым белком, который непрерывно генерируется репортерной конструкцией и его стационарная внутриклеточная концентрация несколько превышает его константу связывания с Keap1.

Для создания более чувствительного клеточного репортера было решено выявить минимальный фрагмент Nrf2, достаточный для распознавания его Keap1 и обеспечения протеасомной деградации Nrf2. Предполагалось, что уменьшение длины домена распознавания до минимальной может изменить его константу связывания с Keap1 и тем самым увеличить чувствительность репортера к активаторам, в особенности к активатором вытеснения. С этой целью были сконструированы дополнительно два репортера с укороченными вариантами Neh2-домена и проведено их сравнение с репортером Neh2-luc, содержащим полноразмерный Neh2-домен белка Nrf2. Связывание с Keap1 укороченных фрагментов Neh2-домена не было подтверждено или опровергнуто экспериментально ни в одной из известных работ.

Материалы и методы

Реактивы. В работе использовали химические реактивы фирмы «Sigma» (США) (если не указано иначе). В качестве контрольного активатора применяли нордигидрогваяретовую кислоту (NDGA) в диапазоне концентраций от

1 до 10 мкМ. При этом сначала делали запасные растворы с разной концентрацией NDGA, растворенной в DMSO. В каждую лунку добавляли запасной раствор (строго по 2 об.%). Превышение 2%-й концентрации DMSO в лунках не допускалось, так как при более высокой объемной концентрации DMSO при трехчасовой инкубации выживает менее половины клеток. Использовали среды для культивирования фирмы «Gibco» (США).

Конструирование целевых репортерных плазмид. Для исследования были выбраны два фрагмента:

Neh2Big (16–96 а.о. домена Neh2), кодируемый последовательностью

GACATGGATTTGATTGACATACTTTGGAGGC
AAGATATAGATCTTGGAGTAAGTCGAGAAGT
ATTTGACTTCAGTCAGCGACGGAAAGAGTAT
GAGCTGGAAAAACAGAAAAAACTTGAAAAG
GAAAGACAAGAACAACCTCCAAAAGGAGCA
AGAGAAAGCSTTTTTTCGCTCAGTTACAACSTA
GATGAAGAGACAGGTGAATTTCTCCCAATTC
AGCCAGCCCAGCACATCCAGTCAGAAACC,

и фрагмент Neh2Small (16–85 а.о. домена Neh2), кодируемый последовательностью

GACATGGATTTGATTGACATACTTTGGAGGCAA
GATATAGATCTTGGAGTAAGTCGAGAAGTATTT
GACTTCAGTCAGCGACGGAAAGAGTATGAGCTG
GAAAAACAGAAAAAACTTGAAAAGGAAGA
CAAGACAACCTCCAAAAGGAGCAAGA
GAAAGCSTTTTTTCGCTCAGTTACAACSTA
GATGAAGAGACAGGTGAATTTCTCCCA.

Для клонирования фрагментов Neh2Small (16–85 а.о.) и Neh2Big (16–96 а.о.) в плазмиду рG13 с помощью программы Clone Manager были подобраны праймеры по сайтам рестрикции HindIII и EheI:

праймер Neh2_HindIII_16

АСТААГСТТGCCACCATGGACATGGATTTGATT
GACATACTTTGGAGGCAAGA;

праймер Neh2_EheI_85

GGACTGGCGCCGGGCCTTTCTTTATGTTTTTGG
CGTCTTCTGGGAGAAATTCACCTGTCTCTTCA
TC;

праймер Neh2_EheI_96

GATTGGCGCCGGGCCTTTCTTTAGTTTTTGC
GTCTTCGGTTTCTGACTGGATGTG.

Фрагменты Neh2Small и Neh2Big были амплифицированы с матрицы кДНК клеток линии рака шейки матки Hela. Подобранная температура для отжига праймеров составляла 55 °С. Выделенные фрагменты клонировали в плазмиду рG13, любезно предоставленную группой экспрессии белковых факторов роста и дифференцировки ИБХ РАН. На первом этапе клонирования проводили рестрикцию плазмиды рG13, а также амплифицированных фрагментов Neh2Small и Neh2Big по сайтам HindIII и EheI. Поскольку для используемых рестриктаз состав буферов различается, сначала была проведена рестрикция по сайту HindIII, затем фрагменты и линейаризованную плазмиду очищали, а после этого проводили вторую рестрикцию по сайту EheI. Обработанные рестриктазами HindIII и EheI фрагменты Neh2Small, Neh2Big, а также более тяжелый фрагмент расщепленной плазмиды рG13 – рG13 EheI-HindIII были выделены и очищены с помощью набора фирмы «Евроген» (Россия). Затем было проведено лигирование рестрикционных фрагментов Neh2Small, Neh2Big и обработанной теми же рестриктазами плазмиды рG13 (EheI-HindIII) с помощью набора фирмы «Хеликон» (Россия). После 1 ч инкубации реакционных смесей при комнатной температуре и инактивации лигазы при 65 °С смеси были трансформированы в предварительно приготовленные компетентные клетки штамма *E. coli* Top10. ПЦР с чашки рG13/Neh2Small и рG13/Neh2Big проводили с праймерами Neh2_16_HindIII, Luc_rev (праймер к 5'-концу гена люциферазы GAGACTCGAGTTACACGGCGATCTTTCC). Проведение ПЦР плазмидной ДНК, выделенной из четырех клонов с чашки рG13/Neh2Big-Luc, и пяти клонов рG13/Neh2Small-Luc подтвердило наличие фрагмента Neh2Big-Luc и Neh2Small-Luc со-

ответственно. Выделение плазмид было проведено по протоколу Miniprep.

На втором этапе конструирования целевых плазмид фрагменты Neh2Small-Luc и Neh2Big-Luc были вырезаны из промежуточных плазмид, получение которых описано выше, и клонированы в плазмиду рсDNA3, содержащую ген резистентности к генетицину. Плазмиды рG13/Neh2Small и рG13/Neh2Big были расщеплены по сайтам HindIII и XbaI в целях получения фрагментов Neh2Small-Luc и Neh2Big-Luc. Этими же рестриктазами была обработана плазида рсDNA3. Фрагменты Neh2Big-Luc и Neh2Small-Luc, а также рсDNA3 XbaI-HindIII выделяли из геля и очищали. Затем проводили лигирование фрагментов Neh2Small-Luc, Neh2Big-Luc и расщепленной плазмиды рсDNA3 (XbaI-HindIII). Для контроля проводили лигирование только рсDNA3 HindIII-EheI. После 1 ч инкубации реакционных смесей при комнатной температуре и инактивации лигазы продукты лигирования были трансформированы в предварительно приготовленные компетентные клетки штамма *E. coli* Top10. Клетки колоний с чашек рсDNA3/Neh2Small-Luc и рсDNA3/Neh2Big-Luc проверяли с помощью ПЦР на наличие в них нужных плазмид. По результатам ПЦР были отобраны две колонии, содержащие плазмиду рсDNA3/Neh2Small-Luc, и две колонии, содержащие плазмиду рсDNA3/Neh2Big-Luc.

Клетки из четырех отобранных колоний нарастили в 5 мл среды LB. Из 3 мл культуральной среды выделяли плазмиды по протоколу Miniprep. Рестрикцией полученных плазмид было подтверждено наличие фрагментов Neh2Small-Luc и Neh2Big-Luc. Препаративное выделение плазмид проводили с помощью набора Qiagen Maxiprep (Германия). Наличие всех встроенных генов без дополнительных мутаций было подтверждено секвенированием полученных плазмид, проведенным компанией «Евроген». Целевые плазмиды (параллельно с использованием плазмиды рсDNA3/Neh2-Luc, предоставленной Н.А. Смирновой) применяли для последующей транзientной трансформации клеток линии Hek293T, а также для получения стабильных линий и репортерного анализа.

Транзientная экспрессия. Трансформацию эукариотических клеток векторными плазмидами осуществляли с помощью реагента Turbofect фирмы «Thermo Fisher Scientific» (США) в соответствии с прилагаемым протоколом. В ходе эксперимента за день до транзientной трансформации клетки линии Hek293T были рассеяны в бе-

лый плоскодонный 96-луночный планшет (10 000 клеток на лунку). Через 24 ч была произведена трансформация клеток. В пробирку с 200 мкл DMEM без FBS добавляли 0,2 мкг плазмиды. Содержимое пробирки тщательно перемешивали с помощью вортекса. Затем в пробирку добавляли 0,4 мкл реактива Turbofect и смесь снова тщательно перемешивали, а затем инкубировали в течение 30 мин. Через 30 мин смесь добавляли к клеткам. Клетки инкубировали в течение 4 ч в DMEM без FBS. Через 4 ч к клеткам добавляли 10% FBS. Через 24 ч к клеткам добавляли исследуемый активатор в желаемом диапазоне концентраций. После трехчасовой инкубации клеток с активатором проводили тест на активность люциферазы, в ходе которого к предварительно лизированным в течение 10 мин клеткам добавляли люциферазный реагент и проводили измерение интенсивности люминесценции. Эксперимент проводили в пяти повторах для каждой плазмиды.

Иммуноблоттинг. Клетки Hek293T были засеяны на 12-луночный планшет в одинаковом количестве, предусмотряемом протоколом для транзиторной трансформации с помощью реагента TurboFect. Через 24 ч клетки были транзитивно трансформированы плазмидами pcDNA3/Neh2Big-Luc и pcDNA3/Neh2-Luc. Еще через 24 ч к клеткам во всех лунках, включая контрольную, в которой находились нетрансформированные Hek293T, добавляли NDGA в конечной концентрации 5 мкМ. Через 3 ч инкубации, клетки подвергали лизису с помощью RIPA-буфера («ThermoFisher Scientific», США), лизаты наносили в разные лунки полиакриламидного геля. После проведения электрофореза собирали кассету для переноса белков из геля на мембрану: на 3 листа фильтровальной бумаги помещали гель, затем на него накладывали мембрану (Immobilon Milipore), предварительно активированную путем инкубирования в течение 20 с в 100%-м метаноле, затем снова накладывали 3 листа фильтровальной бумаги. Перенос осуществляли в буфере (25 мМ Tris – 190 мМ глицин – 20%-й метанол) в течение 2 ч при токе 50 мА. После переноса мембрану извлекали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в 5%-м растворе сухого молока. Растворы первичных антител в необходимой концентрации готовили также в 5%-м растворе сухого молока. Инкубацию с первичными кроличьими антителами к люциферазе («Abcam», США) и к тубулину («Santa Cruz Biotechnology», США) проводили в течение 16 ч. Затем мембрану отмывали 3 раза по 10 мин раствором PBS, содер-

жащим 0,1% Tween 20. Разведение вторичных антител (козьих против кроличьих) в необходимой концентрации готовили в 5%-м растворе сухого молока. Инкубацию со вторичными антителами проводили в течение 1 ч. Затем мембрану трижды отмывали по 10 мин раствором PBS с 0,1% Tween 20. Проявление проводили двумя способами: с помощью хемилюминесцентного субстрата pico-Luciferin PLUS HRP («G-Biosciences», США) или тетраметилбензидином.

Получение и сравнительный анализ репортерных линий, стабильно экспрессирующих слитые с люциферазой фрагменты Neh2 домена. Стабильные линии получали трансформацией клеток Hela плазмидами pcDNA3/Neh2Small-Luc, pcDNA3/Neh2Big-Luc, pcDNA3/Neh2-Luc аналогично протоколу транзиторной трансформации. Линии Hela/Neh2Small-Luc, Hela/Neh2Big-Luc, Hela/Neh2-Luc, стабильно экспрессирующие слитые белки, отбирали в течение 8 пассажей, используя селекцию генетицином, добавляемым в среду для культивирования в концентрации 800 мкг/мл. Нетрансформированные клетки при такой селектирующей концентрации погибают в течение двух дней культивирования.

Клетки всех стабильных линий были рассеяны (10 000 клеток на лунку), через 16 ч к ним добавляли NDGA, растворенную в DMSO, конечная концентрация которой составляла 1, 3, 5, 8, и 10 мкМ. Эксперимент проводили в трех повторах.

Репортерный анализ и статистическую обработку результатов осуществляли так же, как описано нами ранее [10].

Построение модели связывания Neh2-домена с Kelch-доменами димера Keap1. Для построения модели использовали следующий подход: кристаллические структуры PDB4IFL и PDB2DYH из базы данных RCSB PDB были объединены в одну модель в соответствии с расположением димеров, описанным в работе [11], с сохранением концевых фрагментов пептида в обеих молекулах Neh2 и с контролируемой дистанцией между активными сайтами белков, которая составляет порядка 80 Å. С помощью алгоритмов Build protein в программном пакете Discovery Studio 3.0 (Accelrys software, Inc.) были достроены недостающие аминокислоты пептида в соответствии с последовательностью, описанной выше (24–85 а.о. домена Neh2). Применяли фиксированные ограничения координат для белковой части модели и гармонические ограничения на атомы фрагментов пептида, скопированные из кристаллических структур.

К построенной модели применяли силовое поле CHARMM. После чего был запущен протокол стандартного динамического каскада (Standard Dynamics Cascade) для минимизации структуры построенного пептида с помощью программного пакета Discovery Studio 3.0 (Accelrys software, Inc.). Полученная модель (рис. 2) имеет ряд недостатков из-за большого числа энергетически выгодных аналогов трехмерной структуры пептида и ориентации молекул Neh2, поэтому не пригодна для проведения точных молекулярно-динамических расчетов, ее используют только для визуализации.

Результаты и обсуждение

Выбор фрагментов Neh2-домена для получения новых конструкций. Neh2-домен содержит лидерную последовательность из 15 аминокислотных остатков, которая не должна принципиально влиять на его связывание с Keap1. Поэтому при создании первой конструкции было принято решение отрезать указанную последовательность и таким образом клонировать фрагмент, соответствующий последовательности 16–96 а.о. (фрагмент Neh2Big). Низкоаффинный мотив DLG (29–31 а.о.) находится достаточно далеко от N-конца фрагмента, поэтому отсутствие лидерной последовательности не должно компрометировать связывание фрагмента с Keap1. Высокоаффинный мотив связывания ETGE (79–82 а.о.) также находится далеко от C-конца фрагмента (1–96 а.о.). На основе результатов компьютерного моделирования было принято решение сохранить для более короткого фрагмента аминокислотные остатки 83–85, не принимающие участия в связывании Keap1 (рис. 2), так как дальнейшее обрезание может сильно ухудшить связывание

ETGE-мотива. При этом непосредственно за 85 а.о. Neh2-фрагмента следует гибкая, неструктурированная последовательность люциферазы EDAKNIKKGPFYPLEDG (а.о. 4–20, структура люциферазы доступна в базе данных 1LC1.pdb), имеющая в своем составе три остатка лизина, которые при таком слиянии оказываются рядом с растянутой последовательностью Neh2 и в принципе могут также подвергаться убиквитинированию. В этом случае можно ожидать, что скорость убиквитинирования слитого белка будет превышать этот показатель для других вариантов слитых белков, а стационарная концентрация, измеряемая как базовый уровень люминесценции в отсутствие активаторов, будет ниже. В результате можно ожидать увеличение амплитуды отклика репортера при воздействии активаторов Nrf2.

Сравнительный репортерный анализ при транзientной экспрессии. Для сравнения эффективности репортеров на основе фрагментов Neh2Big и Neh2Small с репортером, разработанным в [9] на основе полноразмерного домена Neh2 (1–97 а.о.), была проведена транзientная трансформация клеток Hek293T и изучено воздействие на трансформированные клетки, содержащие репортерные конструкции, такого известного активатора Nrf2, как NDGA.

Как следует из приведенных данных по абсолютным значениям люминесценции (рис. 3.), стационарные уровни сигнала для полученных транзientной экспрессией клеток в отсутствие добавленного активатора различаются. Любопытно, что стационарный уровень сигнала для Neh2Small-Luc в два раза ниже других, что можно интерпретировать как лучшее распознавание данной конструкции Keap1 и последующей системой убиквитинирования. В то же время Neh2Big-Luc

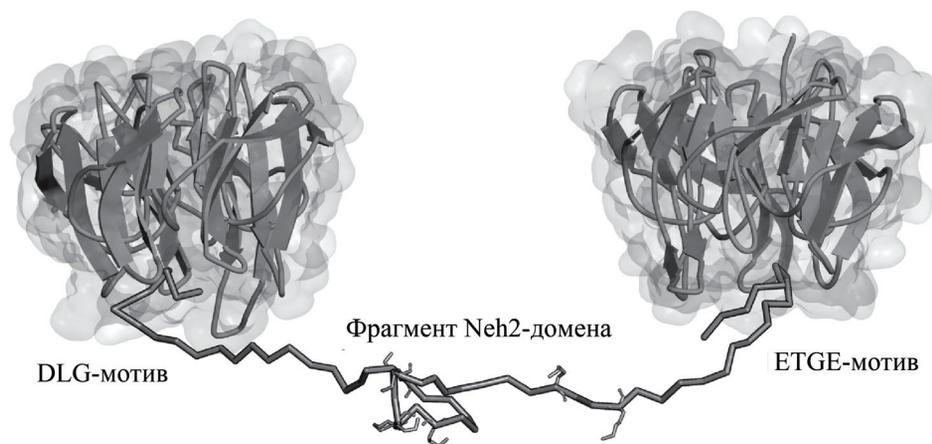


Рис. 2. Взаимодействие Kelch-доменов димерной формы Keap1 с аминокислотными остатками 24–85 Neh2-домена Nrf2

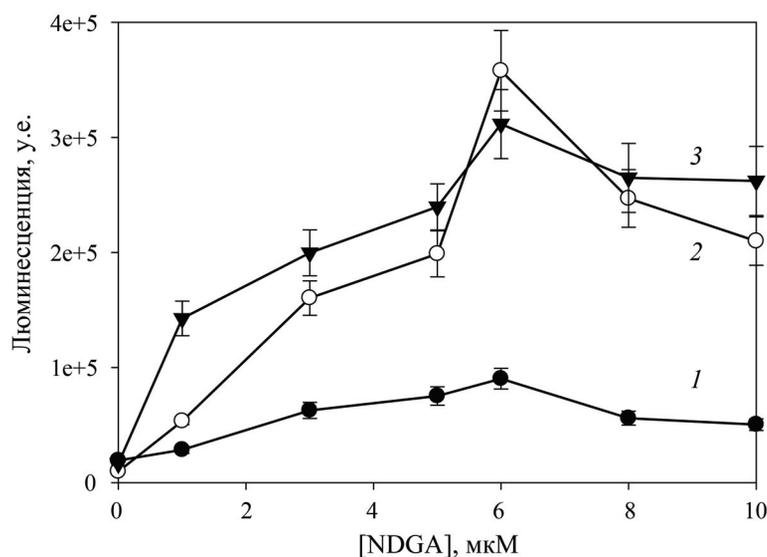


Рис. 3. Сравнение активации клеток HeK293T, транзientно экспрессирующих конструкции слитых белков люциферазы с различными фрагментами Neh2-домена Nrf2, под действием 1–10 мкМ NDGA: 1 – Neh2Big-Luc, 2 – Neh2Small-Luc, 3 – Neh2-Luc

показывает одинаковый уровень стационарного сигнала с полноразмерным вариантом Neh2-Luc, но слабо отвечает на добавление активатора. Это можно объяснить как изменением фолдинга гибридного белка (содержащего фрагмент Neh2Big-Luc) по сравнению с гибридным белком (содержащим полноразмерный домен), так и неоднородностью транзientной трансформации. Поэтому для данного вектора было проведено дополнительное исследование – дана оценка уровня экспрессии слитого белка методом иммуноблоттинга с помощью антител на люциферазу.

Оценка количества слитого белка Neh2Big-Luc при транзientной экспрессии. Для проверки достоверности результатов, полученных в ходе эксперимента с транзientной трансформацией, и исключения ошибки, которая могла возникнуть из-за того, что в разных лунках одной и той же плазмидой могло успешно трансформироваться разное число клеток, был проведен дополнительный эксперимент, детали которого подробно изложены в разделе «Материалы и методы». После инкубации с активатором проведена оценка экспрессии слитого белка люциферазы при транзientной экспрессии двух векторов – плазмиды pcDNA3/Neh2Big-Luc и pcDNA3/Neh2-Luc.

Результаты оценки количества слитых белков представлены на рис. 4. Так как полосы, соответствующие контрольному белку (тубулину, 50 кДа), имели одинаковую яркость и толщину, можно предположить, что число лизированных

и нанесенных на блот клеток во всех случаях одинаково. Полосы, соответствующие репортерному белку Neh2_Luc (~70кДа) (дорожки 1 и 2) оказались приблизительно одинаковой толщины и яркости, что позволило сделать предположение об одинаковой эффективности трансформации клеток в разных лунках плазмидой pcDNA3/Neh2-Luc. Однако полосы, соответствующие репортерному белку Neh2Big-Luc (3–5), оказались разной яркости и толщины (полоса в дорожке 4 менее яркая, чем полосы в дорожках 3 и 5). Таким образом, эффективность трансформации клеток в разных лунках плазмидой pcDNA3/Neh2Big-Luc сильно варьировала. Чтобы иметь корректные сравнительные данные по всем трем репортерным конструкциям, мы получили линии, стабильно экспрессирующие слитые белки.

Сравнительный анализ действия репортерных линий на основе HeLa, стабильно экспрессирующих слитые белки Neh2Small-Luc, Neh2Big-Luc и Neh2-Luc. Для подтверждения результатов транзientной экспрессии были получены стабильные линии трансформации клеток HeLa плазмидами pcDNA3/Neh2Small-Luc, pcDNA3/Neh2Big-Luc и pcDNA3/Neh2-Luc. Репортерные линии HeLa/Neh2Small-Luc, HeLa/Neh2Big-Luc и HeLa/Neh2-Luc, отобранные при селекции генетицином, исследовали по отношению к NDGA (рис. 5). Ожидаемым результатом стало различие базовых сигналов репортерных линий в отсутствие активаторов – отношение сигналов

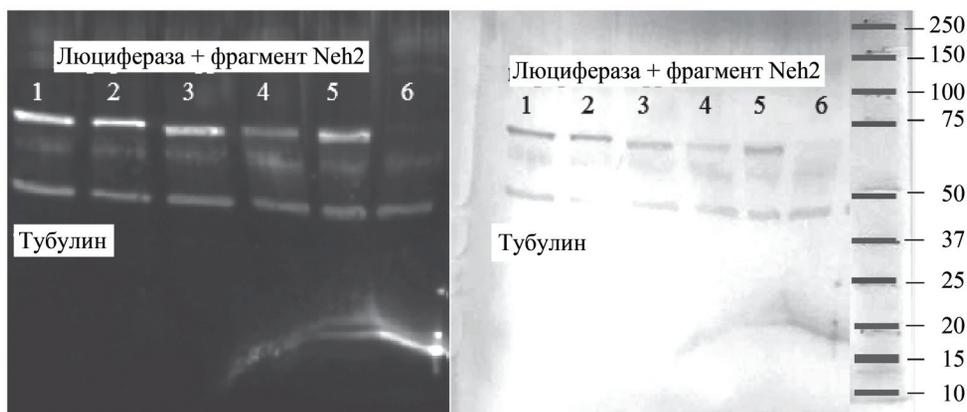


Рис. 4. Вестерн-блот анализ клеток, трансформированных плазмидами pcDNA3/Neh2-Luc (1, 2) и pcDNA3/Neh2Big-Luc (3–5), а так же исходной линии Hek293T (6), с антителами на люциферазу и тубулин, после трехчасовой инкубации репортных линий с 5 мкМ NDGA

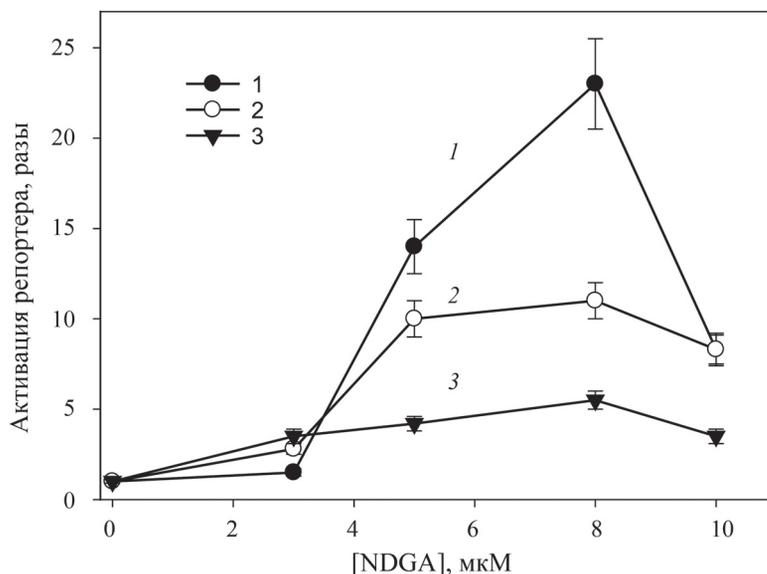


Рис. 5. Сравнительный анализ отклика репортных линий Hela/Neh2Small-Luc (1), Hela/Neh2-Luc (2), и Hela/Neh2Big-Luc (3) на добавление NDGA. Люминесцентный сигнал нормализован на величину сигнала в отсутствие добавленного активатора

Hela/Neh2Small-Luc : Hela/Neh2Big-Luc : Hela/Neh2-Luc составляло 1:2:2, что указывает на лучшее распознавание и процессинг репортера с минимальным фрагментом Neh2. При сравнении относительных сигналов репортеров под действием NDGA, нормализованных на стационарный базовый сигнал каждого репортера (рис. 5), видно, что картина отклика репортеров принципиально совпадает с таковой для транзientной экспрессии (рис. 3).

Репортерная линия на основе фрагмента Neh2Small более чем в два раза превосходит по относительной амплитуде активации репортерную линию с полноразмерным фрагментом Neh2. Ре-

портерная линия на основе фрагмента Neh2Big хотя и активируется с такой же концентрацией полуактивации, как и две другие линии, показывает незначительную амплитуду активации (активация возрастает в 4 раза) по сравнению с 10- и 25-кратной активацией репортеров на основе Neh2-Luc и Neh2Small-Luc соответственно при оптимальной концентрации NDGA, равной 8 мкМ (рис. 3).

Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что фрагмент Neh2Small, во-первых, распознается белком Kear1 и системой убиквитирования, а во-вторых, репортерная линия на его основе обладает повышенной чув-

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., Hushpalian 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., Hushpalian 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. Hushpalian^{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.

Key words: Nrf2, Keap1, luciferase, transcription factor, fusion protein, cell reporter, nordihydroguaiaretic acid.

Сведения об авторах: *Христиченко Анна Юрьевна* – мл. науч. сотр. ООО «НТЦ Биоклиникум» (hristik14@gmail.com); *Хушпульян Дмитрий Михайлович* – вед. науч. сотр. факультета биологии и биотехнологии Национального исследовательского университета «Высшая школа экономики», канд. хим. наук (hushpulian@gmail.com); *Смирнова Наталья Алексеевна* – науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. биол. наук (nasmirno@yahoo.com); *Захарянц Арпеник Акововна* – науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук (arpesha@inbox.ru); *Чубарь Татьяна Анатольевна* – ассистент кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, ст. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук (tchubar@gmail.com); *Тишков Владимир Иванович* – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», профессор, докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com); *Газарян Ирина Георгиевна* – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», докт. хим. наук (igazaryan@gmail.com); *Полозников Андрей Александрович* – заместитель директора по науке Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, канд. хим. наук (andrey.poloznikov@gmail.com).