

УДК 547.97:551.464.796

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТЕТРАСУЛЬФОФТАЛОЦИАНИНА КОБАЛЬТА С ДОПОЛНИТЕЛЬНЫМ БЕЛКОМ ORF8 SARS-CoV-2

© 2023 г. О. И. Койфман^{1, 2}, В. Е. Майзлиш², Н. Ш. Лебедева¹, Е. С. Юрина¹, С. С. Гусейнов¹, Е. Л. Гурьев³, Ю. А. Губарев^{1, *}

¹Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, Иваново, Россия

²Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Россия

³Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

*e-mail: gua@isc-ras.ru

Поступила в редакцию 19.01.2023 г.

После доработки 13.03.2023 г.

Принята к публикации 22.03.2023 г.

Методами спектроскопии и калориметрии изучено взаимодействие водорастворимого тетрасульфофталоцианина кобальта(II) (CoPc) с дополнительным белком ORF8 SARS-CoV-2. Установлено, что белок вызывает смещение агрегационного равновесия в растворах тетрасульфофталоцианина кобальта в сторону димеризации. Димер CoPc связывается с белком ORF8, вероятнее всего, со стороны большего β -листа, вызывая тушение флуоресценции. Константа аффинности белка к димеру CoPc составляет 1.5×10^5 . Методом дифференциальной сканирующей калориметрии установлено, что ORF8 подвергается термоиндуцированной денатурации в температурном интервале 38–67°C. Плавление белка ORF8 осуществляется в две стадии частично накладывающиеся друг на друга. Комплексообразование ORF8 с CoPc приводит к термостабилизации белка, препятствуя второму этапу разворачивания белка. Денатурация комплекса протекает в интервале от 40 до 77°C в две температурно разделенные стадии. Методами гельэлектрофореза и иммуноблоттинга показано, что фотооблучение растворов комплекса белка ORF8 с CoPc видимым светом не приводит к фотоокислению белка. Показано, что водорастворимый сульфозамещенный фталоцианин кобальта может рассматриваться как потенциальный препарат ингибирующий дополнительный белок ORF8.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, металлофталоцианины, белок, комплекс, фотоинаktivация

DOI: 10.31857/S0132344X23600042, **EDN:** TCRLOA

Заболевание COVID-19, вызванное коронавирусом SARS-CoV-2, появившееся в Китае, стремительно распространилось по всему миру и до настоящего времени наносит огромный экономический и социальный ущерб. К настоящему времени эта коронавирусная инфекция привела к смерти более 6.7 млн заболевших. Одной из наиболее частых причин летального исхода является цитокиновый шторм, в возникновении и развитии которого участвуют дополнительные белки вируса SARS-CoV-2, такие как ORF8, ORF10 и ORF3a. К настоящему времени нацеленных на дополнительные белки SARS-CoV-2 и разрешенных к применению лекарственных препаратов нет. Согласно действующим протоколам при возникновении цитокинового шторма используют сочетание ремдесивира с дексаметазоном. Дексаметазон — иммуномодулирующий препарат, но его эффективность при цитокиновом шторме весьма спорна. Например, по данным [1], смертность среди пациентов, получавших одновременно дексаметазон с ремдесивиром, составила 16.7%, а с дру-

гим препаратом тоцилизумабом — 5.3%. Есть сведения и о положительном влиянии применения дексаметазона с ремдесивиром [2]: 30-дневная смертность пациентов, получавших ремдесивир и дексаметазон в дополнение к SOC (стандарт медицинской помощи), составила 12.6% по сравнению с 19.7% для тех, кто получал только SOC. Поэтому поиск соединений способных ингибировать или инактивировать действие дополнительных белков SARS-CoV-2, модулирующих иммунный ответ хозяина и инициирующих цитокиновый шторм, является актуальной задачей. Макроциклические соединения относятся к классу потенциально пригодных для ингибирования и инаktivации вирусов [3, 4]. В наших предыдущих работах было показано, что макрогетероциклические соединения способны образовывать устойчивые комплексы с дополнительными белками SARS-CoV-2, в частности ингибитором белков ORF8 [5], ORF3a [6, 7], ORF10 [8], является 5,10,15,20-тетраakis-(N-метил-3-пиридил)хлорин. Более перспективным методом является фотоинаktivация белка. Мак-

рогетероциклические соединения порфиринового, хлоринового и фталоцианинового класса способны под действием света генерировать активные формы кислорода, которые могут окислять аминокислотные остатки белка необратимо нарушая его структуру и функции [3, 4, 9]. В случае дополнительных белков ORF3a и ORF10 ранее нами было установлено, что они подвергаются фотоинактивации в комплексах с тетрасульфоталоцианином кобальта(II). Эффективность ингибирования/фотоинактивации белка ORF8 SARS-CoV-2 с помощью тетрасульфоталоцианина кобальта(II) (**CoPc**) не исследовалась.

Цель настоящей работы — оценка фотокаталитической активности и ингибирующей способности **CoPc** в отношении дополнительного белка ORF8 SARS-CoV-2.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Соединение **CoPc** синтезировали методом “плавления мочевины” [10, 11]. Полученный расплав растирали, растворяли в воде, раствор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Полученное вещество промывали концентрированной соляной кислотой до бесцветных фильтратов и сушили. Продукт растворяли в воде, водный раствор пропускали через колонку с катионитом КУ-2-8, затем хроматографировали на силикагеле и molselect G-10 последовательно в качестве адсорбентов, собирая наиболее окрашенную зону. Полученный раствор упаривали, а сухой продукт обрабатывали органическими растворителями (метанол, ацетон, бензол) в аппарате Сокслета. Продукт сушили под вакуумом при 100–110°C. Чистота **CoPc** составила не менее 98%.

Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду и фосфатно-солевой буфер pH 7.4 (**PBS**).

Найдено, %: C 42.5; H 1.9; N 12.3; S 14.2.

Для $C_{32}H_{16}NO_{12}S_4Co$

вычислено, %: C 43.1; H 1.8; N 12.6; S 14.4.

Спектр ЭСП (ДМСО; λ_{max} , нм ($\log \epsilon$)): 664(5.15), 602(4.50), 330(4.85) и совпадает с литературными данными [12].

ORF10 экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3) на основе pGBW-m4046950, подаренной Ginkgo Bioworks & Benjie Chen (плазмида Addgene 149258; <http://n2t.net/addgene:149258>; RRID: Addgene_149258). Процедура подробно описана в [6]. Молекулярную массу и аутентичность целевых белков подтверждали методами электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и иммуноблоттинга.

Спектры поглощения и спектры флуоресценции регистрировали на спектрофотометре AvaSpec-

2048 (Avantes BV, Нидерланды) в кюветах 10 мм в термостатируемой ячейке при 25°C.

Термохимические исследования осуществляли на дифференциальном сканирующем калориметре (ДСК) теплового потока DSC 204 F1 (Netzsch Geratebau GmbH, Германия). Образцы (растворы) массой 10–15 мг помещали в запрессованные алюминиевые тигли. В качестве образца сравнения служил пустой алюминиевый тигель. Калориметрический эксперимент проводили в динамической атмосфере сухого аргона (содержание аргона 99.998%) с расходом газа 40 мл мин⁻¹ и скоростью нагрева 1°C мин⁻¹ в интервале температур 12–93°C. Все измерения выполняли относительно базовой линии, полученной для двух пустых тиглей. Температуру и чувствительность калориметра калибровали путем измерения температур и энтальпий фазовых переходов для 11 стандартных веществ: Hg, C₆H₁₂, C₁₂H₁₀, KNO₃, RbNO₃, In, Bi, Sn, Zn, KClO₄ и CsCl. Точность измерения температуры составляла 0.3°C, точность взвешивания — 0.01 мг (Sartorius M2P Balance). Для расчета удельной теплоемкости растворов белков использовали ДСК-кривые: базовая линия, стандарт, образец. В качестве стандарта служил сапфир. Все три измерения проводили последовательно в течение суток. Используя программное обеспечение для DSC 204 F1 Phoenix и экспериментальные значения температурной зависимости удельной теплоемкости стандарта (сапфира) были получены температурные зависимости удельных теплоемкостей раствора белка и чистого буфера. С помощью программы Origin, находили разность удельных теплоемкостей раствора белка в буфере и чистого буфера. По температурной зависимости разности удельных теплоемкостей после вычитания сигмоидальной базовой линии, определяли положения пиков.

Образцы для электрофореза и иммуноблоттинга готовили смешиванием в молярном соотношении 1 : 1 белка ORF8 с **CoPc** в **PBS**. Инкубировали в течение 1 ч в темноте или при облучении белым светом (мощностью 10 Вт). Пробы смешивали в объемном соотношении 4 : 1 с 5× буфером для образцов (0.3 M Tris-ОН pH 6.8, 10% SDS, 25% меркаптоэтанол, 50% глицерин, 0.005% бромфеноловый синий) и проводили электрофорез в 12% полиакриламидном геле (TGX Stain-Free™ Fast-Cast™ Acrylamide Kit 12%, Bio-Rad, США). Изображение геля получали по технологии бескрасочной визуализации с использованием системы ChemiDoc (Bio-Rad, США). В случае белка ORF10 электрофорез проводили в 15% полиакриламидном геле, который затем окрашивали раствором кумасси голубого R-250 (Thermo, США).

Белки переносили с геля на поливинилпирролидонную мембрану Immobilon-P (Merck, Германия) с использованием системы полусухого

переноса Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, США). Мембрану блокировали в течение 1 ч 5% раствором сухого молока в буфере TBS-T (20 mM трис, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5). Инкубировали мембрану в течение 1 ч в 1 : 500 растворе первичных антител (Rabbit Polyclonal SARS-CoV-2 ORF8 Antibody, FabGenix, США) в 5% сухом молоке в буфере TBS-T. Трижды отмывали мембрану буфером TBS-T в течение 5 мин. Инкубировали мембрану в течение 1 ч в 1 : 10000 растворе вторичных антител (Goat Anti-Rabbit IgG H&L HRP, Abscam, Великобритания) в 5% сухом молоке в буфере TBS-T. Отмывали мембрану, как описано выше. Инкубировали мембрану 5 мин в растворе субстрата пероксидазы (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, США), визуализировали с помощью системы ChemiDoc.

Молекулярный докинг выполнен в программе AutoDock Vina 1.1.2 [13] и визуализирован в PyMol 2.4.1. Структура ORF8 D-I-Tasser (QHD43422.pdb) была загружена на сайте Лаборатории Жанга [14, 15]. Структура CoPc минимизирована в ORCA 4.0 [16] с использованием методов DFT. Для исключения сайтов связывания, с которыми не могут быть образованы связи из-за электростатического отталкивания на основе уравнения Пуассона—Больцмана [17], рассчитан заряд поверхности белковой глобулы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор водорастворимого кобальт(II)фталоцианина в качестве потенциального ингибитора и инактиватора обусловлен активностью данного металлофталоцианина в отношении других дополнительных белков SARS-CoV-2, но и вероятной локализацией CoPc в составе комплекса с ORF8 (рис. 1). Согласно данным молекулярного докинга, CoPc может стыковаться с ORF8 с достаточной высокой энергией, составляющей 8.2–8.7 ккал/моль двумя способами (рис. 1). Одна молекула CoPc локализуется в ORF8 вблизи аминокислотной последовательности 73–75, отвечающей за агрегацию белка ORF8 и стыковку с главным комплексом гистосовместимости I (MHC-I), предотвращая выделение вирусных антигенов на поверхность клетки под действием MHC-I [18]. Вторая CoPc расположена в непосредственной близости к N-терминальному фрагменту белка, отвечающему за встраивание в эндоплазматический ретикулум, подавляя выработку β -интерферонов [19]. Положительным также является факт близкого расположения одного из фотоулавливаемых аминокислотных остатков — цистеина, занимающего 20, 25, 83 и 90 положения в полипептидной цепи ORF8. Следует отметить, что, согласно полученным теоретическим данным, CoPc не образует аксиальных связей с электронодонорными атомами белка, что также является необходимым условием

для применения макрогетероциклического соединения для фотоинактивации [20].

Рекомбинантный белок ORF8 был спектрально охарактеризован ранее [5], наличие собственной флуоресценции белка с максимумом 345 нм позволило провести прямое флуоресцентное титрование растворов белка CoPc (рис. 2). Титрование раствором CoPc дополнительного белка ORF8 приводит к тушению флуоресценции белка. Обработка полученных результатов спектрального титрования в приближении Скетчарда показала, что аффинность белка к ORF8 достаточно высокая, константа Скетчарда составила 1.5×10^5 . Зависимость в координатах Скетчарда линейна ($R^2 = 0.988$), следовательно белок ORF8 связывает CoPc единственным возможным способом. Следует отметить, что в исходном фосфатном буферном растворе CoPc находится в частично димеризованном состоянии, о чем говорит наличие поглощения в области 630 нм (рис. 3) [21]. Обратное титрование растворов CoPc раствором белка с контролем по ЭСП CoPc показало, что увеличение содержания ORF8 в анализируемом растворе приводит к уменьшению отношения оптической плотности раствора при 650/630 нм. Это свидетельствует о том, что белок инициирует димеризацию макрогетероциклических молекул. Таким образом, судя по данным прямого и обратного титрования, можно заключить, что CoPc связывается с белком в димерной форме.

Дополнительную информацию о взаимодействии CoPc с ORF8 можно получить по данным ДСК. На рис. 4 представлены температурные зависимости избыточных удельных теплоемкостей растворов ORF8 и его комплекса с CoPc до и после облучения. Как видно из рис. 4, характер зависимости удельной теплоемкости растворов ORF8 сложный. На начальном этапе регистрируется эндозэффект с максимумом 32.6°C, начиная с 45°C избыточная теплоемкость раствора ORF8 нелинейно возрастает. Возрастание значений теплоемкости раствора отражает увеличение степеней свободы и интенсивности молекулярных движений белка. Очевидно, что при повышении температуры появляется колебательная подвижность более крупных участков полипептидной цепи. Это делает возможным конформационные переходы белка, связанные с разрушением нативной структуры, дополнительной гидратацией аминокислотных остатков белка, изолированных ранее в структуре свернутой молекулы. Как видно из полученной зависимости (рис. 4), разворачивание белка происходит в два этапа, которым соответствуют два максимума на кривой избыточной теплоемкости при 47–48 и 57.6°C. Ядро ORF8 содержит два антипараллельных β -листа (beta-sheet). Меньший лист состоит из β_2 , β_5 и β_6 , а больший — из β_3 , β_4 , β_7 и β_8 [22]. Именно это строение позволяет ORF8

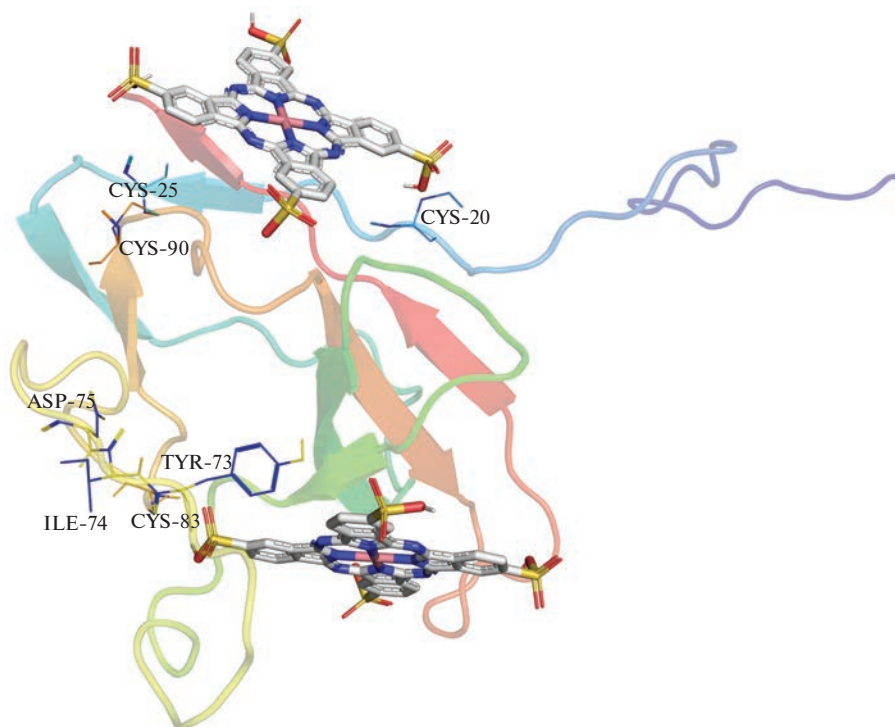


Рис. 1. Результаты молекулярного докинга дополнительного белка ORF8 SARS-CoV-2 с CoPc.

оказывать сильное ингибирующее действие на интерферон I типа (IFN- β), интерферон ISRE и промотор, чувствительный к NF- κ B [19]. Полученные термодинамические данные позволяют предположить, что первый пик на рис. 4 (область 47–48°C) связан с нарушением β -складчатости меньшего листа, а при 57.6°C происходит разворачивание большого листа. Дальнейшее уменьшение теплоемкости растворов, очевидно, связано

с агрегацией полипептидных цепей ORF8 после денатурации белка.

Связывание ORF8 с димерами CoPc приводит к изменению кривой удельной теплоемкости как в области низких, так и в области высоких температур, первый экстремум с максимумом 36.6°C имеет экзотермический характер, возможно, он связан со структурированием, происходящим в

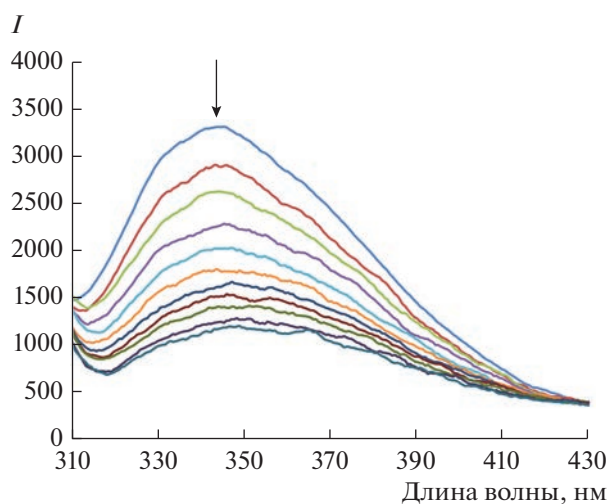


Рис. 2. Спектры флуоресценции ORF8 (2.24×10^{-5} M) при титровании CoPc ($0-2.2 \times 10^{-5}$ M) в PBS pH 7.4.

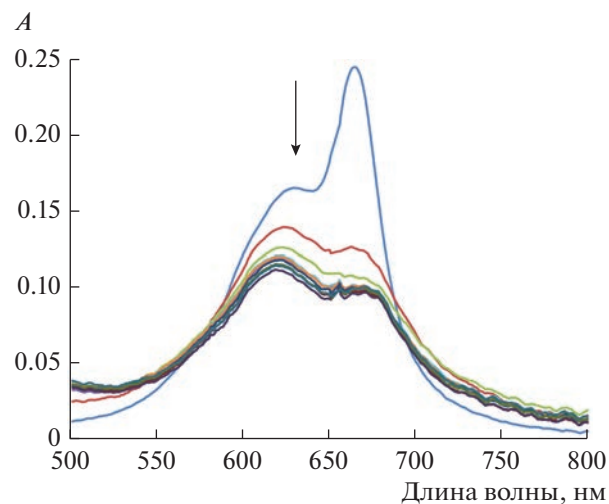


Рис. 3. ЭСП CoPc (1.1×10^{-5} M) при титровании ORF8 ($0-1.12 \times 10^{-5}$ M) в PBS (pH 7.4).

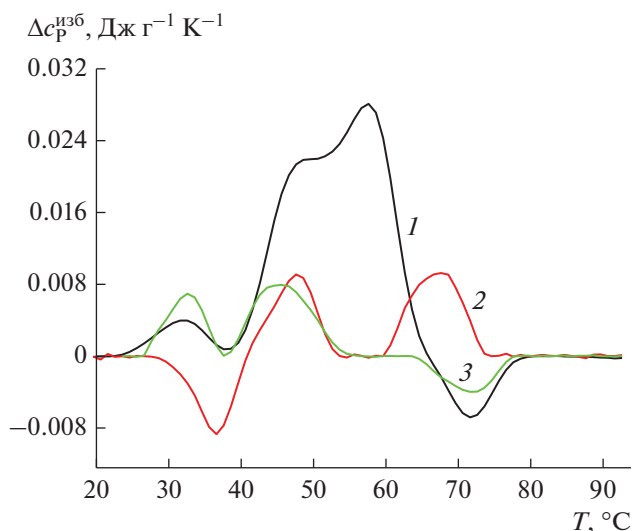


Рис. 4. Температурные зависимости избыточных удельных теплоемкостей растворов ORF8 (1) и его комплекса с CoPc до (2) и после облучения (3).

системе. Это может быть вызвано уменьшением электростатического отталкивания между противоположно заряженными группами CoPc и аминокислотными остатками полипептидной цепи. Процесс термоденатурации комплекса ORF8 с димерами CoPc, как и индивидуального белка ORF8, протекает в две стадии. Однако для ком-

плекса эти стадии температурно разделены. Первый эндоэффект имеет максимум при той же температуре, что и чистый белок (47.6°C). Второй эндоэффект в комплексе ORF8-CoPc по сравнению с ORF8 смещен в более высокотемпературную область, температура максимума 68°C. Очевидно, что димеры CoPc стабилизируют белок ORF8, препятствуя второму этапу разворачивания белка. Если наше предположение о последовательности термодеструкции ORF8 верно, то вероятнее всего, димеры CoPc расположены со стороны большого β-листа. Интересно отметить, что последующий экзоэффект в высокотемпературной области в случае ORF8-CoPc не регистрируется.

Следующим этапом работы являлась оценка фотовоздействия видимым светом (400–700 нм, 10 Вт, 1 ч) на комплекс димеров CoPc с ORF8. Облучение анализируемых растворов существенно повлияло на ход кривой избыточной теплоемкости. Ход кривой облученного комплекса ORF8-CoPc практически полностью совпадает с температурной зависимостью избыточной теплоемкости индивидуального белка ORF8 за исключением второго этапа, разворачивания белка, который в данном случае не фиксируется. Вероятно, фотооблучение приводит к незначительным локальным изменениям в ORF8, термическая денатурация которого в результате происходит в одну стадию, а сам комплекс во время облучения, вероятно, диссоциирует. Для получения дополнительной информации о влиянии фотооблучения на растворы ORF8-CoPc

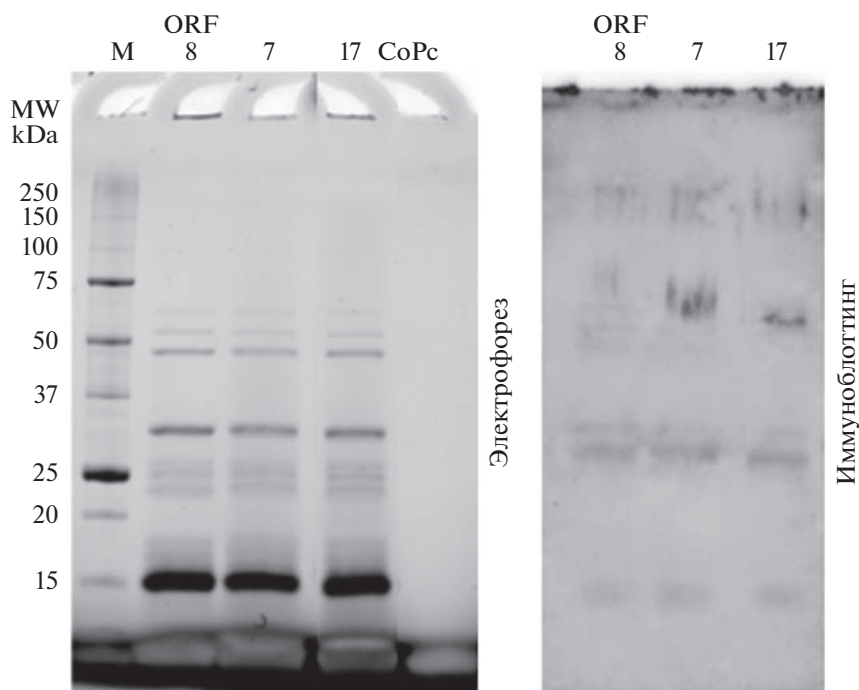


Рис. 5. Результаты электрофореза и иммуноблоттинга белка ORF8 до и после инкубации с CoPc: М — маркеры молекулярной массы; ORF8 — исходный белок ORF8; 7 — ORF8 + CoPc; 17 — ORF8 + CoPc + $h\nu$.

были проведены исследования исходного ORF8, СоРс и их комплексов до и после облучения методами электрофореза и иммуноблоттинга (рис. 5). В нижней части геля, вблизи фронта электрофореза, визуализируются СоРс. Инкубация белка ORF8 с веществом СоРс в темноте (рис. 5, дорожка 7) при облучении (рис. 5, дорожка 17) не привела к изменению картины электрофореза и иммуноблоттинга. Полученные данные подтверждают вывод, сделанный при анализе данных ДСК об отсутствии фотокаталитической активности СоРс в отношении белка ORF8. Возможной причиной низкой фотокаталитической активности СоРс в процессах окисления белка ORF8 является димеризация СоРс, вызывающая уменьшение квантового выхода синглетного кислорода.

SARS-CoV-2 развил несколько механизмов для уклонения от иммунной системы хозяина, таких как опосредованная ORF8, подавляющая регуляция МНС-I и ингибирование выработки β -интерферонов. Проведенное исследование показало, что взаимодействие водорастворимого тетрасульфозамещенного фталоцианина кобальта с белком ORF8 приводит к димеризации СоРс. Димеры сульфозамещенного фталоцианина кобальта связываются с дополнительным белком SARS-CoV-2, вероятно, в области большего β -листа, что может способствовать восстановлению адаптивного иммунитета во время инфекции SARS-CoV-2. По причине димеризации СоРс нецелесообразно рассматривать в качестве фотосенсибилизатора для фотоокисления ORF8 SARS-CoV-2, так как в димеризованном состоянии он проявляет низкую фотокаталитическую активность.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-73-20140).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Garcia-Vidal C., Meira F., C  zar-Llist   A. et al. // *Revista Espa  ola de Quimioterapia*. 2021. V. 34. P. 136. <https://doi.org/10.37201/req/018.2021>
2. Benfield T., Bodilsen J., Brieghel C. et al. // *Clin. Infect. Dis.* 2021. V. 73. P. 2031. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab536>
3. Koifman O., Ageeva T., Kuzmina N.S. // *Macroheterocycles*. 2022. V. 15. P. 207. <https://doi.org/10.6060/mhc224870k>
4. Lebedeva N.S., Gubarev Y.A., Koifman M.O. et al. // *Molecules*. 2020. V. 25. P. 4368. <https://doi.org/10.3390/molecules25194368>
5. Gubarev Y.A., Lebedeva N.S., Yurina E.S. et al. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2022. P. 1. <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2079562>
6. Lebedeva N.S., Gubarev Y.A., Mamardashvili G.M. et al. // *Sci. Reports*. 2021. V. 11. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99072-8>
7. Koifman O.I., Lebedeva N.S., Gubarev Y.A. et al. // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2021. V. 57. P. 423. <https://doi.org/10.1007/s10593-021-02920-8>
8. Koifman M.O., Malyasova A.S., Romanenko Y.V. et al. // *Spectrochim. Acta. A*. 2022. V. 279. P. 121403. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121403>
9. Koifman O.I., Ageeva T.A., Beletskaya I.P. et al. // *Macroheterocycles*. 2020. V. 13. <https://doi.org/10.6060/mhc200814k>
10. Weber J.H., Busch D.H. // *Inorg. Chem.* 1965. V. 4. P. 469. <https://doi.org/10.1021/ic50026a007>
11. Шапошников Г., Кулинич В., Майзлиш В. Модифицированные фталоцианины и их структурные аналоги. М.: Красанд, 2012.
12. Майзлиш В., Мочалова Н., Снегирева Ф. и др. // *Изв. вузов. Хим. и хим. технол.* 1986. Т. 29. P. 3.
13. Trott O., Olson A.J. // *J. Comput. Chem.* 2010. V. 31. P. 455. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
14. Zhang C., Zheng W., Huang X. et al. // *J. Proteome Res.* 2020. V. 19. P. 1351. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00129>
15. Zheng W., Zhang C., Li Y. et al. // *Cell Reports Methods*. 2021. P. 100014. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100014>
16. Neese F. // *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2022. V. 12. Art. e1606. <https://doi.org/10.1002/wcms.1606>
17. Baker N.A., Sept D., Joseph S. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. V. 98. P. 10037. <https://doi.org/10.1073/pnas.181342398>
18. Zhang Y., Chen Y., Li Y. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2021. V. 118. Art. e2024202118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2024202118>
19. Li J.-Y., Liao C.-H., Wang Q. et al. // *Virus Res.* 2020. V. 286. P. 198074. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198074>
20. Lebedeva N.S., Yurina E.S., Gubarev Y.A. et al. // *J. Photochem. Photobiol. A*. 2018. V. 353. P. 299. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.11.037>
21. Lebedeva N.S., Popova T., Mal'kova E. et al. // *Russ. J. Phys. Chem. A*. 2013. V. 87. P. 2030. <https://doi.org/10.1134/S0036024413120133>
22. Flower T.G., Buffalo C.Z., Hooy R.M. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2021. V. 118. Art. e2021785118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021785118>