

УДК 577.112.083; 576.524

ДИМЕРНЫЕ ДИЗИНТЕГРИНЫ ИЗ ЯДА СТЕПНОЙ ГАДЮКИ *Vipera ursinii*Е. В. Крюкова^{1,*}, А. С. Потапенко¹, Т. В. Андреева¹, И. А. Иванов¹,
В. В. Рябинин¹, Р. Х. Зиганшин¹, В. Г. Старков¹, Н. М. Айвазян²,
член-корреспондент РАН В. И. Цетлин¹, Ю. Н. Уткин¹

Поступило 18.06.2019 г.

Из яда степной гадюки *V. ursinii* с использованием жидкостной хроматографии выделены четыре димерных дизинтегрин. Дизинтегрин предотвращали адгезию клеток MCF7 к фибронектину, что свидетельствует об их взаимодействии с интегринами рецепторами $\alpha V\beta 1$ -типа. По данным масс-спектрометрии молярные массы дизинтегринов находятся около 14 кДа. Методом пептидного картирования установлена структура нового гетеродимерного дизинтегрин массой 13 995,5 Да и показана его принадлежность к классу RGD/KGD-содержащих дизинтегринов.

Ключевые слова: интегрин, дизинтегрин, яд, гадюка, клетки MCF7.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524885567-570>

Интегрин — это семейство трансмембранных рецепторов, широко представленных на мембранах клеток позвоночных животных и человека [1]. Они состоят из двух субъединиц α и β в различных сочетаниях. Всего известно 18 α - и 8 β -субъединиц, которые образуют 24 варианта интегрина рецепторов [1]. Функции интегрина рецепторов связаны с механизмами межклеточных взаимодействий и с прикреплением клеток к белковым внеклеточным матрицам. Строение α -субъединицы определяет специфичность интегрина: например, эта субъединица распознает мотив RGD в таких субстратах, как фибронектин, фибриноген и витронектин [2]. Известно, что интегрина рецепторы экспрессируются на поверхности опухолевых клеток, определяя их способность к метастазированию [3]. Интегрин на поверхности тромбоцитов, содержащие $\beta 1$ - или $\beta 3$ -субъединицы, влияют на процессы свертываемости крови и образование тромбов [4].

Ряд белков из ядов змей обладает способностью взаимодействовать с интегрин. Среди них дизинтегрин — низкомолекулярные белки, обнаруженные в яде змей семейства *Viperidae*. Они содержат RGD/KGD- или KTS-последовательность, характерную для большинства известных дизинтегринов [5].

Дизинтегрин обладают антикоагулянтным действием и препятствуют интегрин-зависимой адгезии

клеток, в том числе и опухолевых. Таким образом, они рассматриваются как потенциальные терапевтические препараты для лечения заболеваний, связанных с нарушением свертываемости крови, онкологических и др.

Несмотря на то что структура дизинтегринов относительно консервативна, они значительно различаются по сродству к разным подтипам рецепторов [5]. Поэтому поиск новых активных и специфических соединений является актуальной задачей. Ранее было показано, что в яде змей семейства *Viperidae* присутствуют дизинтегрин, содержащие разные интегринсвязывающие мотивы и специфичные к определенным рецепторам [5]. Кроме того, методом протеомного анализа нами было установлено, что в яде степной гадюки *Vipera ursinii* (VU) присутствуют белки, гомологичные дизинтегрин [6]. Данные о структуре и специфичности дизинтегринов яда степной гадюки, имеющей широкий ареал обитания (распространена в Европе и Азии, в том числе и на территории России), в настоящее время отсутствуют. В представленной работе проведено выделение и характеристика дизинтегринов из яда этой змеи.

Разделения яда VU проводили в два этапа. На первом этапе цельный яд растворяли в воде и разделяли методом гель-фильтрации на колонке Superdex 75 10/300 GL (1 × 30 см, GE Healthcare), уравновешенной 0,1 М ацетатом аммония (рН 6,2) (рис. 1а). После разделения цельного яда VU гель-фильтрацией было получено пять фракций, белковые фракции лиофилизировали и анализировали их анти-интегринную активность с помощью теста адгезии клеток MCF7. В качестве матрикса для адгезии клеток использовали фибронектин, который

¹ Институт биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии наук

² Институт физиологии им. Л.А. Орбели Национальной
академии наук Республики Армения, Ереван, Армения

*E-mail: evkr@mail.ru

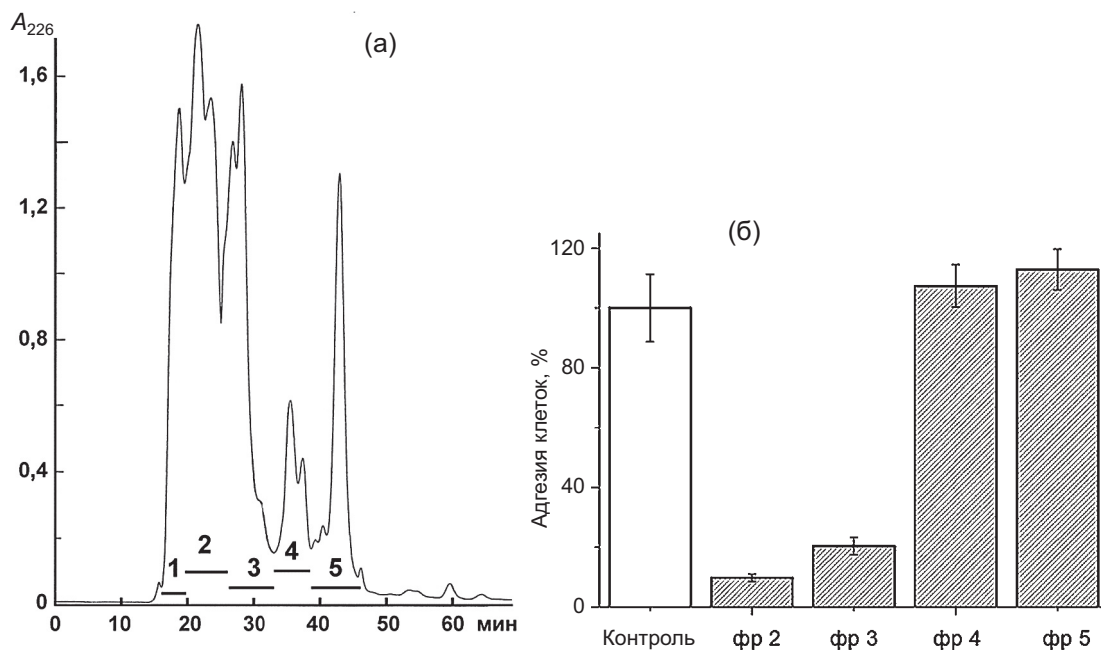


Рис. 1. а – Профиль разделения яда *V. ursinii* методом гель-фильтрации на колонке Superdex 75. Отмечены номера собранных фракций. б – Влияние фракций яда *V. ursinii* (0.1 мкг/мл), полученных в результате разделения яда гель-фильтрацией, на адгезию клеток MCF-7 к фибронектину. Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 12$). За 100% принята адгезия клеток на планшет без дизинтегринов.

NSGNPCCDPVTCKPRRGEHCVSGPCCRNCKFLNAGTICKYAR**GGDDMNDYCTGISSDCPRNPYKD** A
 GNELLQNSGNPCCDPVTCKPRLGEHCVSGPCCDNCKFKRAGTVCRPA**KGDWNDYCTGISSDCPRNPWNG** B

Схема 1. Аминокислотные последовательности цепей дизинтегрин 2.4 VU. А. Цепь, идентичная цепи А дизинтегрин VB7A из яда *V. berus*. Б. Цепь, идентичная фрагменту аминокислотной последовательности металлопротеиназы класса РII из яда носатой гадюки *V. ammodytes ammodytes* (код базы данных UniProt KB A0A1I9KNT0_VIPAA). Различающиеся аминокислотные остатки выделены серым.

служит субстратом для связывания экспрессированного на мембранах MCF7 интегрин $\alpha V\beta 1$ -типа [7]. Клетки после инкубации с исследуемыми соединениями вносили в лунки 96-луночного планшета, предварительно обработанные фибронектином (50 мкл, 2 мкг/мл) и инкубировали в течение 1 часа в термостате. В контрольные лунки вносили клетки без добавления исследуемых соединений, после чего лунки отмывали раствором питательной среды ДМЕМ (“Панэко”, Россия) от неприкрепившихся клеток 2×100 мкл среды. Количество оставшихся в планшете клеток оценивали спектрофотометрически с помощью МТТ теста. Активные фракции яда препятствовали адгезии клеток к фибронектину (рис. 1б). Фракцию 2, показавшую максимальный эффект в тесте с клетками MCF7, подвергали дальнейшему разделению методом обращённо-фазовой ВЭЖХ на колонке Jupiter C18 с использованием градиента ацетонитрила в присутствии 0,1%-й трифторуксусной кислоты, после чего снова оценивали активность полученных фракций.

Использование этого метода хроматографии привело к выделению четырёх индивидуальных соединений, обладающих способностью ингибировать адгезию клеток MCF7 к фибронектину и обозначаемых далее как 2.1–2.4. Методом хроматомасс-спектрометрии определены молярные массы всех выделенных белков, которые очень близки и составили 14018,1; 14017,7; 13982,3 и 13995,5 Да для белков 2.1, 2.2, 2.3 и 2.4 соответственно.

Ранее в яде гадюки обыкновенной *V. berus berus*, родственного VU вида, был обнаружен димерный дизинтегрин VB7, близкий по молярной массе к выделенным нами соединениям, который ингибировал адгезию клеток, экспрессирующих рецепторы $\alpha 5\beta 1$, к иммобилизованному фибронектину [8]. Дизинтегрин VB7 является гетеродимером и состоит из двух полипептидных цепей массой 7 кДа каждая, связанных между собой двумя дисульфидными связями [8]. Учитывая этот факт, выделенные нами из яда VU белки анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS в восстанавливающих и невосстанавливающих усло-

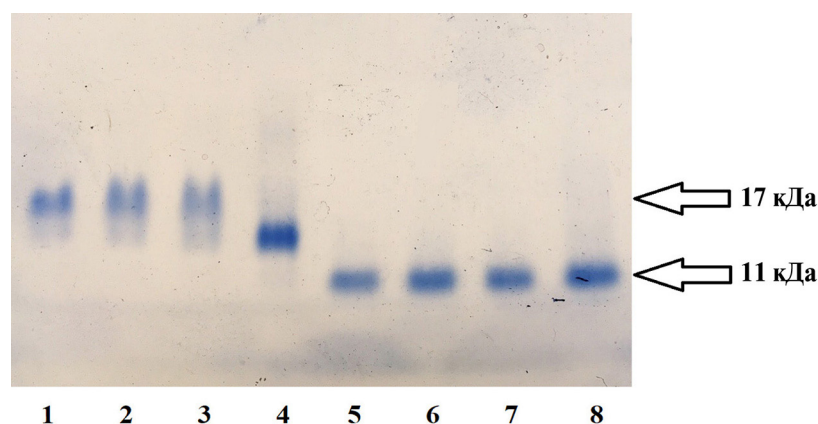


Рис. 2. Электрофорез в ПААГ фракций яда *V. ursinii*. Лунки 1, 2, 3 и 5, 6, 7 – фракции 2.1, 2.2, 2.3 соответственно. Лунки 4 и 8 – фракция 2.4. Лунки 1–4 – невозстанавливающие условия, лунки 5–8 – восстанавливающие условия. Окрашивание Кумасси. Стрелками показано положение стандартов – белков с указанными молекулярными массами.

виях с целью обнаружения димеров. По результатам электрофореза в невозстанавливающих условиях (рис. 2) видно, что белки 2.1–2.3 обладают одинаковой электрофоретической подвижностью, соответствующей подвижности белка с массой ~17 кДа. Белок 2.4 отличается по подвижности от этих трёх, а его подвижность соответствует массе ~15 кДа, что близко массе, определённой методом масс-спектрометрии (13995,5 Да; рис. 3).

Разная электрофоретическая подвижность белков с близкой массой может быть обусловлена как различиями в их аминокислотных последовательностях, так и особенностями вторичной структуры (разное замыкание дисульфидных связей). В восстанавливающих условиях белки показали одинаковую подвижность, соответствующую по массе мономерам (~10 кДа). Таким образом, все выделенные нами дизинтегрины обладают способностью взаимодействовать с $\alpha V\beta 1$ -типом интегриновых рецепторов и являются димерами.

Дизинтегрин 2.4 с молекулярной массой 13995,5 Да, отличающийся от остальных электрофоретической подвижностью, анализировали методом масс-спектрометрического пептидного картирования. С этой целью был проведён его гидролиз трипсином с последующим анализом полученных пептидных фрагментов тандемной масс-спектрометрией, сопряжённой с высокоэффективной жидкостной хроматографией (LC-MS/MS) с использованием масс-спектрометра Q-Exactive HF (“Thermo Scientific”) [9]. Анализ данных с целью поиска гомологичных последовательностей белков проводили при помощи компьютерной программы PEAKS Studio 8.0 build 20 160 908. Результаты анализа показали, что аминокислотная последовательность одной из цепей белка 2.4 VU идентична цепи А дизинтег-

рина VB7A из яда *V. berus* (схема 1). Обе цепи состоят из 64 аминокислот, содержат 10 остатков цистеина и RGD-мотив. Другая цепь белка 2.4 VU гомологична, но не идентична цепи В дизинтегрина VB7B из яда *V. berus*. Обе цепи содержат KGD-мотив и 10 остатков цистеина, но их аминокислотные последовательности различаются по составу и длине и состоят из 64 и 70 остатков для цепей VB7B и 2.4 VU соответственно. Цепь В дизинтегрина 2.4 *V. ursinii* идентична фрагменту, представляющему собой дизинтегрин, аминокислотной последовательности металлопротеиназы класса РІІ (код базы данных UniProt KB A0A1I9KNT0_VIPAA) из яда носатой гадюки *V. ammodytes ammodytes* (схема 1).

Таким образом, из яда *V. ursinii* нами выделены четыре димерных дизинтегрина, взаимодействующих с $\alpha V\beta 1$ -типом интегриновых рецепторов. Такое большое количество димерных дизинтегринов в яде одного вида обнаружено впервые. Установлена структура нового гетеродимерного дизинтегрина, принадлежащего к классу RGD/KGD-содержащих дизинтегринов.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–54–05012.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takada Y., Ye X., Simon S. The Integrins // Genome Biol. 2007. V. 8. № 5. P. 215. doi: 10.1186/gb-2007-8-5-215
2. Ruoslahti E. RGD and Other Recognition Sequences for Integrins // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1996. V. 12. P. 697–715. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.697
3. Hamidi H., Pietilä M., Ivaska J. The Complexity of Integrins in Cancer and New Scopes for Therapeutic Targeting // Br. J. Cancer. 2016. V. 115. № 9. P. 1017–1023. DOI: 10.1038/bjc.2016.312

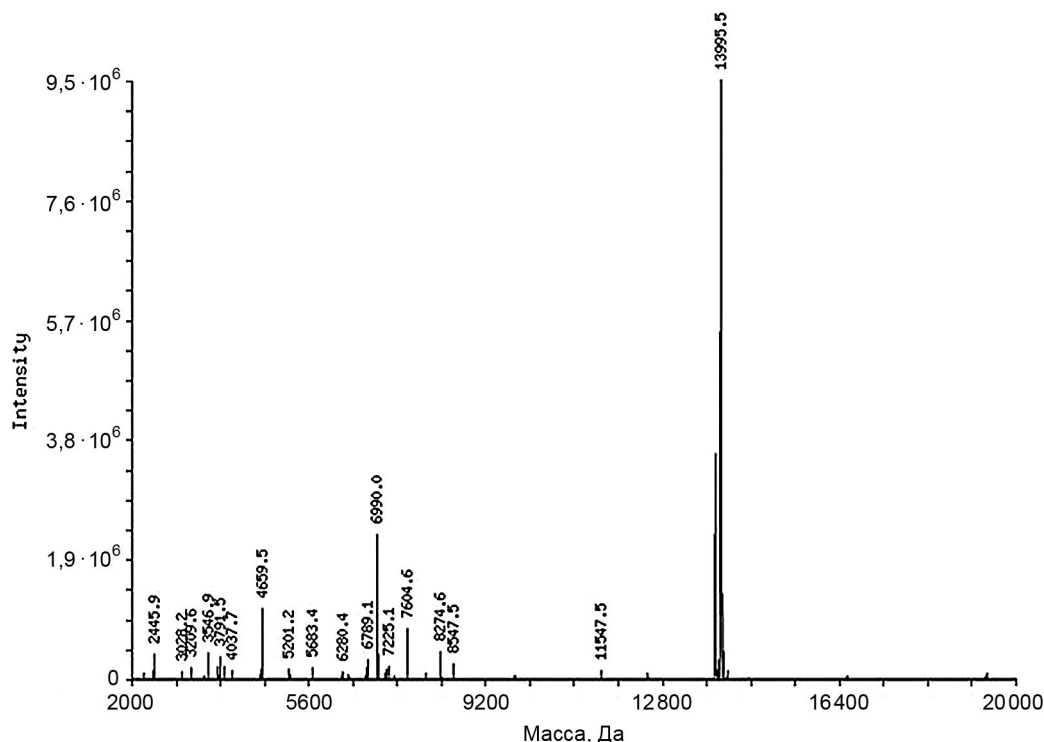


Рис. 3. Масс-спектр дезинтегрин 2.4 из яда *V. ursinii*.

- Huang J., Li X., Shi X., et al. Platelet Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$: Signal Transduction, Regulation and Its Therapeutic Targeting // *J. Hematol. Oncol.* 2019. V. 12. 1. P. 26. DOI: 10.1186/s13045-019-0709-6.
- Macêdo J., Fox J., Souza Castro M. Disintegrins from Snake Venoms and Their Applications in Cancer Research and Therapy // *Current Protein & Peptide Science.* 2015. V.16. № 6. P. 532–548. DOI: 10.2174/1389203716666150515125002
- Kovalchuk S.I., Ziganshin R.H., Starkov V.G., et al. Quantitative Proteomic Analysis of Venoms from Russian Vipers of Pelias Group: Phospholipases A2 Are the Main Venom Components // *Toxins (Basel).* 2016. V. 8. № 4. P. 105. DOI: 10.3390/toxins8040105
- Taherian A., Li X., Liu Y., et al. Differences in Integrin Expression and Signaling within Human Breast Cancer Cells // *BMC Cancer.* 2011. V. 11. P. 293. DOI: 10.1186/1471-2407-11-293
- Calvete J., Moreno-Murciano M., Theakston R., et al. Snake Venom Disintegrins: Novel Dimeric Disintegrins and Structural Diversification by Disulphide Bond Engineering // *Biochem. J.* 2003. V. 372. P. 725–734. DOI: 10.1042/BJ20021739
- Ryabinin V.V., Ziganshin R.H., Starkov V.G., et al. Intraspecific Variability in the Composition of the Venom from Monocled Cobra (*Naja kaouthia*) // *Russian J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. № 2. P. 107–121.

DIMERIC DISINTEGRINS FROM THE *Vipera ursinii* STEPPE VIPER VENOM

E. V. Kryukova¹, A. S. Potapenko¹, T. V. Andreeva¹, I. A. Ivanov¹,
V. V. Ryabinin¹, R.H. Ziganshin¹, V.G. Starkov¹, N.M. Ayvazyan²,
Corresponding Member of the RAS V.I. Tsetlin¹, Yu.N. Utkin¹

¹Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

²L. Orbeli Institute of Physiology National Academy of Sciences Republic Armenia, Yerevan, Armenia

Received June 18, 2019

Four dimeric disintegrins were isolated from the venom of the steppe viper *V. ursinii* using liquid chromatography. Disintegrins prevented adhesion of MCF7 cells to fibronectin, which indicates their interaction with integrin receptors of the $\alpha\text{V}\beta\text{1}$ type. According to mass spectrometry data, the molar masses of disintegrins are about 14 kDa.

Keywords: integrin, disintegrin, venom, viper, MCF7 cells.