

## ИНГИБИРОВАНИЕ ХЕЛИКАЗЫ UL9 ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА АНАЛОГАМИ НЕТРОПСИНА И ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ БИС-НЕТРОПСИНОВ

© 2012 г. Н.П. Бажулина, А.Н. Суровая, Я.Г. Гурский\*, В.Л. Андропова\*\*, В.С. Архипова, М.В. Головкин, А.М. Никитин, Г.А. Галегов\*\*, С.Л. Гроховский, Г.В. Гурский

ФГБУ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва ул. Вавилова, 32;

E-mail: annasur@immb.ru

\* ФГБУ кардиологический научно-производственный комплекс, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15 а;

\*\*ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

Поступила в редакцию 19.01.12 г.

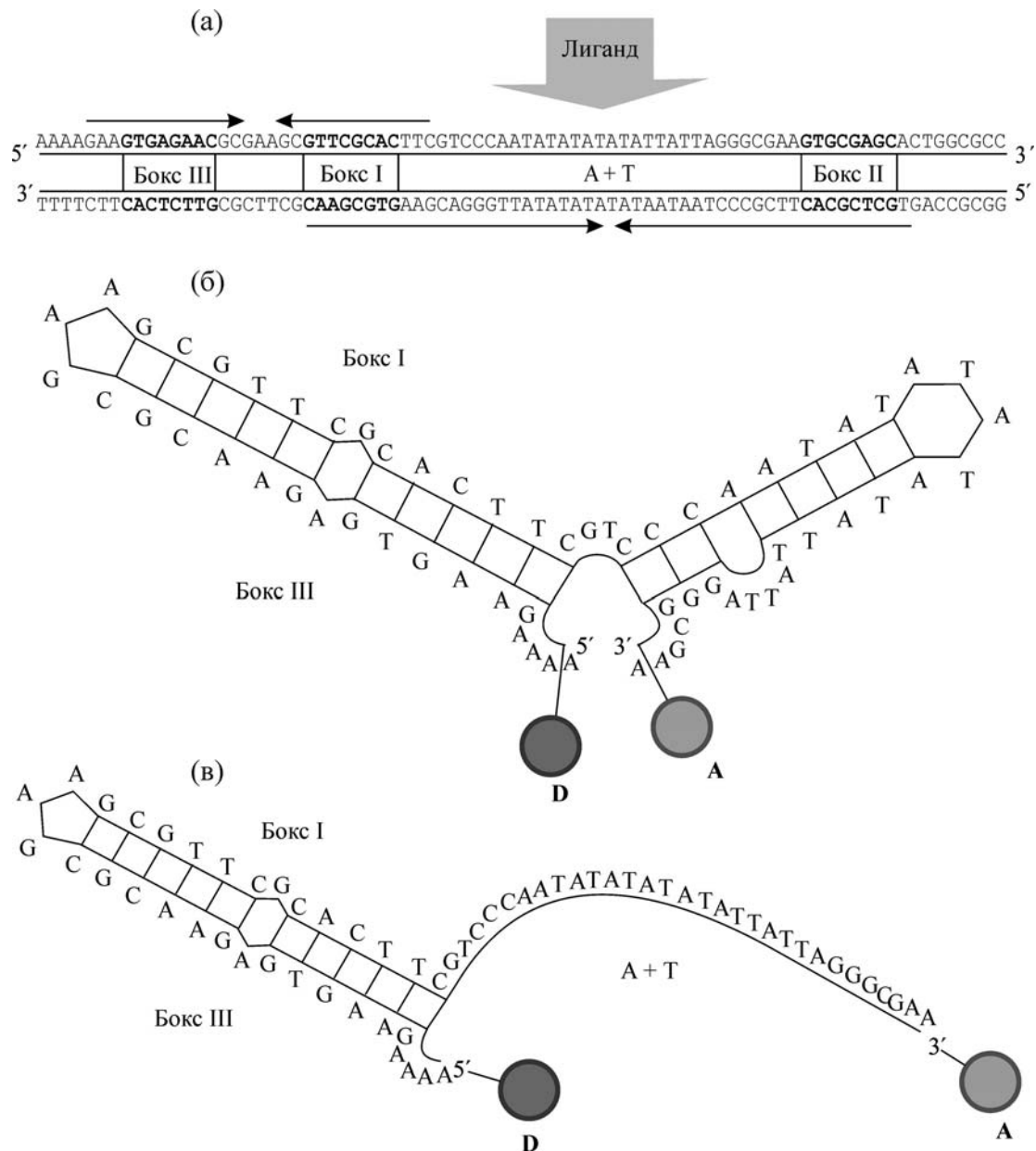
Получены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что мишенью для противовирусного действия димерных производных антибиотика нетропсина являются комплексы, образуемые хеликазой UL9 вируса простого герпеса с началом репликации вирусной ДНК, включающим два сайта OriS и один сайт OriL. Согласно данным ДНКазного футпринтинга бис-нетропсины избирательно связываются с А+Т-кластером в OriS. Бис-нетропсины стабилизируют структуру А+Т-кластера и ингибируют вызванное тепловыми флуктуациями раскрытие АТ-пар оснований, которое необходимо для инициации процесса раскручивания ДНК хеликазой UL9. С помощью измерения эффективности резонансного переноса энергии (FRET-метод) между флуоресцентными зондами, присоединенными ковалентно к 3'- и 5'-концам олигонуклеотидов в минимальном дуплексе OriS, исследована кинетика раскручивания ДНК хеликазой UL9. Показано, что Pt-бис-нетропсин ингибирует процесс раскручивания минимального дуплекса OriS хеликазой UL9. Он также уменьшает скорость раскручивания хеликазой АТ-богатой шпильки в верхней нити минимального дуплекса OriS. Исследована противовирусная активность новых димерных аналогов нетропсина и их действие на инфицированных вирусом герпеса лабораторных животных.

*Ключевые слова:* димерные производные нетропсина, футпринтинг, вирус простого герпеса, инициация репликации, хеликаза UL9, раскручивание ДНК, FRET-метод, противовирусная активность.

Одним из путей воздействия на инфекцию, вызванную вирусом простого герпеса, является использование в качестве потенциальных лекарственных агентов химических соединений, способных избирательно связываться с вирусной ДНК и ингибировать активность ключевых вирусных ДНК-связывающих белков [1,2]. Ранее мы обнаружили, что димерные производные антибиотика нетропсина избирательно связываются с А+Т-кластером в начале репликации вируса простого герпеса и эффективно подавляют репродукцию вируса в культуре клеток Vero [3–5]. Они обладают также лечебным действием на инфицированных вирусом герпеса лабораторных животных [6].

В настоящем сообщении мы приводим экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что мишенью для действия этих соединений является комплекс, образуемый хеликазой UL9 вируса простого герпеса с началом ре-

пликации вирусной ДНК OriS или OriL [7–16]. Бис-нетропсины при связывании с А+Т-кластером в OriS стабилизируют его структуру и ингибируют вызванное тепловыми флуктуациями раскрытие АТ-пар оснований [17–20], которое необходимо для инициации процесса раскручивания ДНК хеликазой UL9 [10–16]. С помощью измерения эффективности резонансного переноса энергии между флуоресцентными зондами, присоединенными ковалентно к 3'- и 5'-концам олигонуклеотидов в минимальном дуплексе OriS, исследована кинетика раскручивания ДНК хеликазой UL9. Показано, что Pt-бис-нетропсин ингибирует процесс раскручивания минимального дуплекса OriS хеликазой UL9. Мы исследовали также противовирусную активность бис-нетропсинов и их лечебный эффект на вирусную инфекцию у инфицированных вирусом герпеса лабораторных животных.



**Рис. 1.** Нуклеотидная последовательность в начале репликации OriS вируса простого герпеса первого типа (а). Стрелками показаны два участка с палиндромными последовательностями. (б), (в) – Связывающие места I и III для хеликазы (боксы I и III), а также A+T-кластер и бокс II. D и A – молекулы донора и акцептора, связанные ковалентно с 5'- и 3'-концами олигонуклеотида.

На рис. 1 представлена нуклеотидная последовательность минимального дуплекса OriS, показаны структуры шпилек, образуемых верхней нитью дуплекса после раскручивания ДНК хеликазой UL9, и схематически иллюстрированы основные принципы развиваемого в настоящей работе подхода, основанного на измерениях эффективности резонансного переноса энергии между флуоресцентными зондами, присоединенными к 3'- и 5'-концам олигонуклеотидов.

Известно, что в присутствии АТФ и другого вирусного белка ICP8 (single-stranded DNA binding protein) инициаторный белок UL9 вызывает раскручивание ДНК в OriS и OriL, что приводит к инициации репликации вирусной ДНК [10–16]. В отсутствие ICP8 хеликаза UL9 раскручивает ДНК более медленно [12,13].

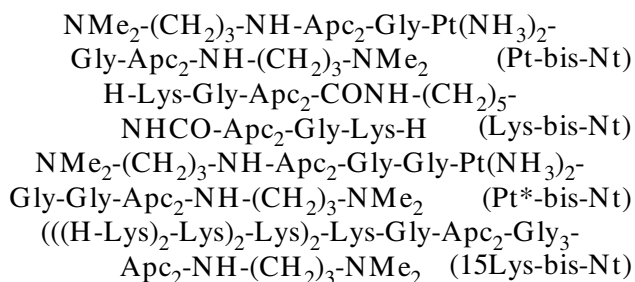
После расплетения минимального дуплекса OriS хеликаза UL9 связывается с одним из однотяжевых олигонуклеотидов (верхняя нить в OriS) [14–16]. В растворе этот олигонуклеотид

спонтанно образует две шпильки – GC-богатую шпильку, стабилизированную комплементарными парами оснований в боксах I и III, и AT-богатую шпильку, в которую входят основания A+T-кластера и примыкающие к нему нуклеотиды [14–16].

В экспериментах *in vitro* мы использовали инициаторный белок UL9 вируса простого герпеса и флуоресцентно-меченые фрагменты ДНК, входящие в OriS. Ранее ген UL9 вируса герпеса (штамм L2 из коллекции Института вирусологии им. Д.И. Ивановского) был амплифицирован с помощью ПЦР, вставлен в плазмиду pET14 и экспрессирован в клетках *E. coli* [20]. Рекомбинантный белок UL9 образует специфические комплексы с боксами I и II в OriS и обладает хеликазной и АТФазной активностями [20].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Лиганды.** Химические структуры бис-нетропсинов, использованных в настоящей работе, приведены ниже:



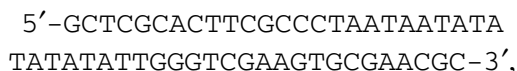
Здесь Apc – остаток 1-N-пропил-4-аминопиррол-2 карбоновой кислоты.

Pt-bis-Nt и Pt\*-bis-Nt содержат *цис*-диаминоплатиную группу в соединительной цепи между двумя нетропсиновыми фрагментами. Pt-bis-Nt и Pt\*-bis-Nt были синтезированы в соответствии с процедурой, описанной в работе [21]. Отличие каждого ди-N-пропил пирролкарбоксамидного фрагмента молекулы бис-нетропсина от нетропсина (Nt) состоит в замене N-метилпиррольных циклов на N-пропилпиррольные, замене C-концевой амидиновой группы на остаток третичного амина, а также в замене присутствующего в нетропсине остатка гуанидилуксусной кислоты на остатки глицина. Эти замены увеличивают устойчивость соединений к деградации в водных растворах. Концентрации бис-нетропсинов определяли спектрофотометрически, используя коэффициент молярной экстинкции при 297 нм, равный  $42000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

**Рекомбинантный белок UL9.** Для синтеза полноразмерного рекомбинантного белка UL9 в клетках *E. coli* BL21 (DE3) использовалась

модифицированная плазида pET14, содержащая ген UL9 вируса простого герпеса первого типа (штамм L2 из коллекции Института вирусологии им. Д.И. Ивановского) [20]. Белок содержит гистидиновый «таг» – кластер из шести остатков гистидина на N-конце, что позволяет использовать металлхелатирующие (Ni-NTA) колонки для очистки белка. Последующая очистка белка включает диализ и хроматографию на фосфоцеллюлозе P11. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, используя коэффициент молярной экстинкции для мономера UL9 при 280 нм, равный  $89000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Рекомбинантный белок UL9 хранился в буфере А, содержащем 20 мМ трис HCl (pH 7,2); 20 мМ HEPES-NaOH; 0,54 М NaCl, 0,01% твин 20; 0,10 мМ EDTA; 1 мМ дитиотреитола и 20 об.% глицерина.

**ДНКазный футпринтинг.** Фрагмент ДНК получали расщеплением модифицированной плазмиды pGEM7(f+) (Promega), содержащей вставки олигонуклеотидов с псевдосимметричными последовательностями, рестриктазами NcoI и ApaI [22]. Фрагмент также содержал вставку из начала репликации вируса герпеса OriS с последовательностью



включающей A+T-кластер и связывающие места для хеликазы UL9. Для введения радиоактивной метки по 3'-концу фрагмента использовали [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP (Изотоп, Москва), немеченые dNTP и фрагмент Кленова ДНК полимеразы I *Escherichia coli*. Выделение фрагмента проводилось в 5%-м полиакриламидном геле [23].

Футпринтинг комплексов фрагмента ДНК с бис-нетропсинами проводили, как описано ранее [22]. Для приготовления комплекса 10 мкл раствора фрагмента (примерно  $10^4$  Бк) 10 мМ трис-HCl (pH 7,5), 0,5 М NaCl (pH 6), смешивали с 10 мкл раствора лиганда в воде и охлаждали до 0°C. К смеси добавляли 20 мкл раствора ДНКазы I в 10 мМ трис-HCl (pH 6), 0,25 М NaCl, 5 мМ MnCl<sub>2</sub> и выдерживали 3 мин при 0°C. Для остановки реакции добавляли 85 мкл раствора 0,15 М NaCl, 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ EDTA, 10 мкг/мл ТРНК, ДНК экстрагировали фенолом, осаждали этанолом, промывали 70%-м этанолом, высушивали, растворяли в 1 мкл 95% формамида, содержащего 15 мМ EDTA, 0,05% бромфенолового синего и 0,05% ксиленианола FF, нагревали 1 мин при 90°C, быстро охлаждали и наносили на 6%-й денатурирующий полиакриламидный гель длиной 40 см с градиентной

толщиной 0,15–0,45 мм [22]. Электрофорез проводили 60 мин при 2500 В. Перед экспонированием гель фиксировали в 10%-й уксусной кислоте и высушивали на стекле, предварительно обработанном гамма-метакрилпропилокси-силаном (ЛКВ, Швеция).

**Олигонуклеотидные конструкции.** В качестве субстратов для исследования ДНК-связывающей и хеликазной активностей рекомбинантного белка UL9 мы использовали следующие олигонуклеотидные конструкции:



Олигонуклеотиды (S1-S9) были синтезированы фосфоамидитным методом и очищены с помощью электрофореза в полиакриламидном геле («Синтол», Россия). Красители были присоединены ковалентно к 3'- и 5'-концам олигонуклеотидов S5–S8 с помощью аминоксаметиленовых линкеров. Здесь R6G и Cy5 – аналоги 6-карбосиродамина G и цианинового красителя Cy5 соответственно. BHQ2 – нефлуоресцирующий краситель (Black hole quencher 2). Красители R6G и Cy5 служат в качестве донора энергии электронного возбуждения, а BHQ2 является ее акцептором при резонансном переносе энергии электронного возбуждения от донора к акцептору по механизму Ферстера в олигонуклеотидах (S5), (S6) и (S8). Эффективность переноса энергии зависит от расстояния  $R$  между донором и акцептором как  $1/R^6$  [24]. Она также зависит от величины интеграла перекрытия нормированного спектра флуоресценции донора и спектра поглощения акцептора. От величин интеграла перекрытия, квантового выхода флуоресценции донора и величины коэффициента, учитывающего взаимную ориентацию переходных моментов молекул донора и акцептора, зависит величина  $R_0$  – критическое расстояние между донором и акцептором, при котором вероятность безизлучательного переноса энергии от донора к акцептору равна вероятности испускания кванта света донором в отсутствие акцептора. По нашим данным для пар красителей R6G – BHQ2 радиус миграции энергии  $R_0$  равен 63 Å.

**Хеликазная активность.** В экспериментах по связыванию и раскручиванию ДНК инициаторным белком UL9 мы использовали в качестве субстратов олигонуклеотидные конструкции (S1)+(S2), (S5)+(S2), (S4)+(S2), а также (S5)+(S9), (S4)+(S9), (S3)+(S6) и (S3)+(S7)+(S8). При температуре 42°C в среднем три пары оснований в дуплексе (S1)+(S2) находятся в расплетенном состоянии и могут служить в качестве «зародыша» для катализируемого хеликазой перехода «спираль–клубок» в А+Т-кластере. При инкубации дуплекса (S1)+(S2) с хеликазой UL9 и АТФ в течение 60 мин при 42°C образуется небольшое количество продукта с подвижностью в полиакриламидном геле, соответствующей подвижности комплекса однотяжевого олигонуклеотида с хеликазой UL9 [20]. В качестве субстрата для хеликазы UL9 мы использовали также олигомер (S3)+(S7)+(S8) и олигонуклеотидные конструкции (S5)+(S9), (S4)+(S9) и (S3)+(S6). Каждая из этих конструкций имеет однотяжевый хвост на 3'-конце верхней нити в минимальном дуплексе OriS. Для образования олигомера (S3)+(S7)+(S8) или 63-членного дуплекса (S4)+(S2), (S5)+(S2) комплементарные нити смешивали в эквимольных концентрациях, смеси отжигали при 90°C, а затем охлаждали до комнатной температуры в течение 8–10 ч. Нуклеотидная последовательность минимального дуплекса (63 пары оснований) соответствует фрагменту ДНК в начале репликации OriS вируса простого герпеса первого типа. Этот фрагмент включает А+Т-кластер и связываю-

щие места I и III для инициаторного белка UL9.

**Приборы и методы.** Спектры кругового дихроизма измеряли на приборе Jasco-720, используя кюветы с длиной оптического пути 1,0; 0,1 и 0,2 см. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Jasco V-550. Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse. Исследования проводили в 0,001 М Na-какодилатном буфере в присутствии 0,1 М NaCl, pH 7,0. Бис-нетропсины растворяли в небольшом количестве этанола, а затем переводили в упомянутый выше буфер.

Тушение флуоресценции донора, вызванное безизлучательным переносом энергии электронного возбуждения от донора к акцептору (Förster mechanism of resonance energy transfer, FRET) [24], зависит от расстояния между донором и акцептором в ДНК и ДНК-белковом комплексе

$$I_{DA}/I_D = 1/(1 + (R_0/R)^6). \quad (1)$$

Здесь  $I_D$  – интенсивность флуоресценции донора в отсутствие акцептора.  $I_{DA}$  – интенсивность флуоресценции донора в присутствии акцептора.  $R$  – расстояние между донором и акцептором.  $R_0$  – критическое расстояние между донором и акцептором, при котором вероятность резонансного переноса энергии от донора к акцептору равна вероятности излучения кванта света донором в отсутствие акцептора.

$$R_0 = 10^{-5}(880K^2n^{-4}q_DJ)^{1/6}\text{Å} \quad (2)$$

Здесь  $q_D$  – квантовый выход флуоресценции донора,  $n$  – индекс рефракции среды, разделяющей молекулы донора и акцептора,  $K^2$  – коэффициент, зависящий от взаимной ориентации переходных моментов молекул донора и акцептора. Для случайной взаимной ориентации переходных моментов  $K^2 = 2/3$ .  $J$  – интеграл перекрытия нормированного спектра флуоресценции донора и спектра поглощения акцептора. Для определения эффективности переноса энергии  $1 - I_{DA}/I_D$  необходимо измерить интенсивности флуоресценции донора в системе, содержащей олигонуклеотид с двумя зондами (D и A), а также в системе, содержащей олигонуклеотид, который конъюгирован только с донором (D).

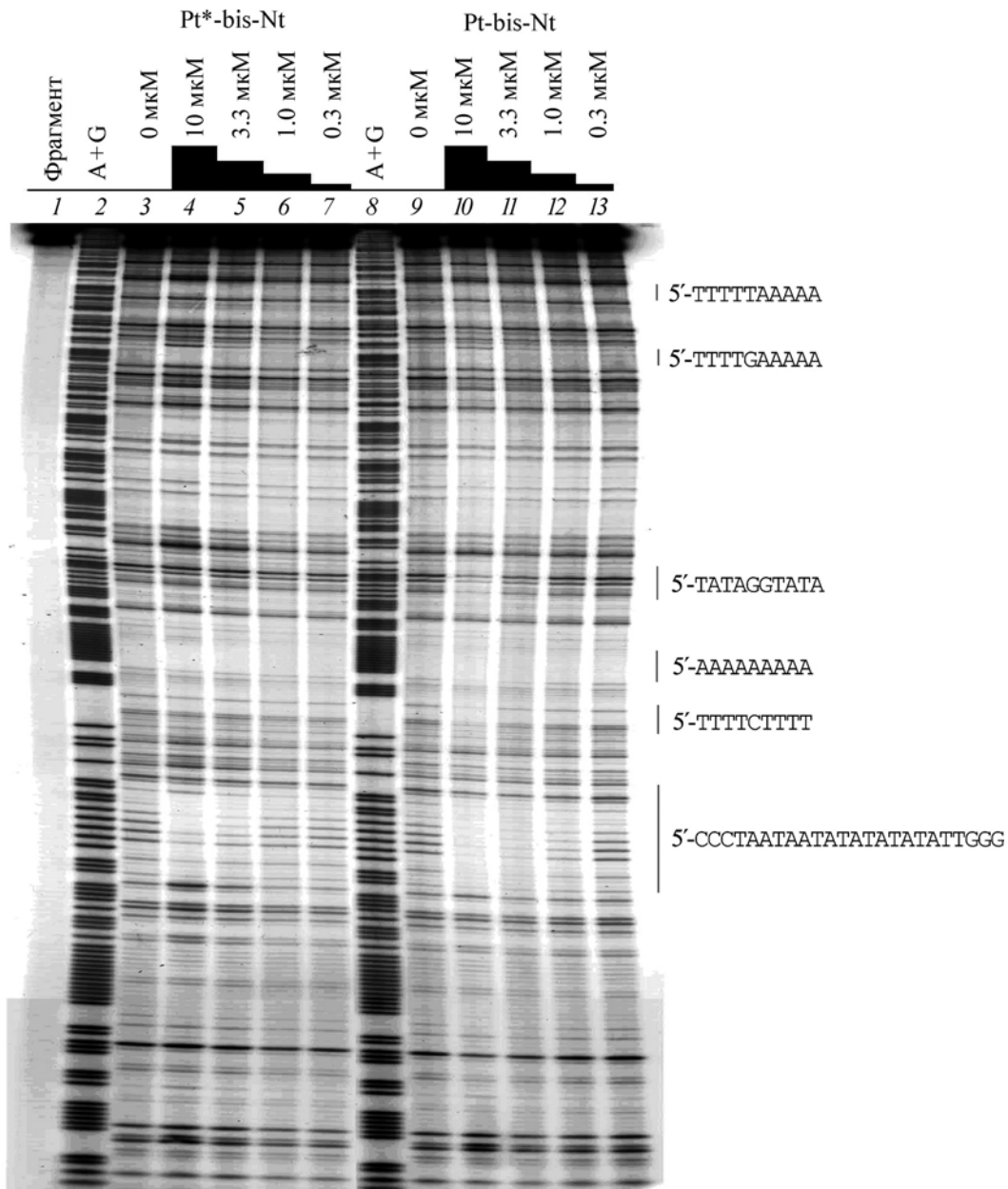
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Специфичность связывания бис-нетропсинов с началом репликации OriS.** На рис. 2 приведена диаграмма футпринтинга комплексов Pt-bis-Nt и Pt\*-bis-Nt с фрагментом ДНК, который со-

держит вставку с последовательностью, соответствующей началу репликации OriS вируса герпеса, а также вставки олигонуклеотидов с псевдосимметричными последовательностями, которые могут служить в качестве сильных мест связывания для Pt-bis-Nt и Pt\*-bis-Nt.

Как видно из рис. 2, оба бис-нетропсина защищают А+Т-кластер от расщепления ДНК-азой I. Концентрационные зависимости защитного эффекта показывают, что Pt-bis-Nt образует более прочный комплекс с А+Т-кластером, чем Pt\*-bis-Nt. При низких концентрациях Pt-bis-Nt защищает от расщепления более протяженный участок ДНК, чем Pt\*-bis-Nt. Ранее было показано, что Lys-bis-Nt и 15Lys-bis-Nt связываются избирательно с протяженными кластерами АТ-пар оснований [5,17]. Pt-bis-Nt защищает от расщепления А+Т-кластер и участки ДНК с псевдосимметричными последовательностями, содержащими кластеры из четырех АТ-пар оснований, которые разделены одной или двумя GC-парами оснований. Примером может служить участок с последовательностью 5'-ТАТАГГТАТА-3', в котором наблюдается ярко выраженный защитный эффект в присутствии 3,3 мМ Pt-бис-нетропсина, в то время как в присутствии Pt\*-bis-Nt защитный эффект не наблюдается даже при втрое раза большей концентрации бис-нетропсина.

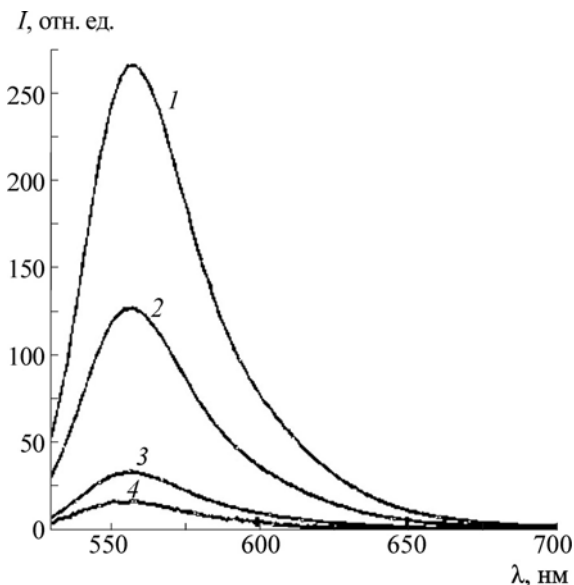
**Хеликазная активность инициаторного белка UL9 вируса герпеса.** После отжига олигонуклеотидов (S5) и (S2) образуется дуплекс, который содержит А+Т-кластер и связывающие места I и III для хеликазы. Верхняя нить в этом дуплексе сама по себе при комнатной температуре сворачивается в две шпильки, одна из которых включает основания, присутствующие в боксах I и III. Эта шпилька богата GC-парами. По нашим данным, она плавится при температуре 83°C, в то время как вторая шпилька, состоящая преимущественно из АТ-пар оснований, неустойчива и является полностью расплавленной при температуре 45°C [14,15]. В двушпильчатой структуре олигонуклеотида (S5) (или (S6)) 5'- и 3'-концы олигонуклеотида являются пространственно сближенными. Таким образом, если при связывании хеликазы UL9 с дуплексом структура дуплекса деформируется и в обеих нитях образуются шпильки, то молекулы донора и акцептора, находящиеся на 5'- и 3'-концах каждого олигонуклеотида, оказываются пространственно сближенными (рис. 1). Это проявляется в тушении флуоресценции донора акцептором. Интенсивность флуоресценции свободного олигонуклеотида (S5) значительно меньше, чем интенсивность флуоресценции дуплекса, в котором флуоресцентные зонды раз-



**Рис. 2.** Профили расщепления фрагмента, содержащего участок начала репликации OriS, ДНКазой I. Дорожка 1 – исходный фрагмент без обработки; дорожки 2, 8 – A+G-химическое расщепление по пуринам; дорожки 3, 9 – расщепление ДНКазой I свободного фрагмента; дорожки 4–7 – расщепление ДНКазой I фрагмента в присутствии 10; 3,3; 1 и 0,3 мкМ Pt\*-bis-Nt соответственно; дорожки 10–13 – расщепление ДНКазой I фрагмента в присутствии 10; 3,3; 1 и 0,3 мкМ Pt-bis-Nt соответственно.

делены большим расстоянием. Эффективность переноса энергии электронного возбуждения от D к A  $1 - I_{DA}/I_D$  для свободного олигонуклеотида изменяется в пределах от 0,74 до 0,88. Эти значения  $1 - I_{DA}/I_D$  указывают на то, что (S5) находится в форме шпильки в растворе. Аналогичные результаты получены для олигонуклеотидов (S6) и (S8). При добавлении хеликазы UL9 к олигонуклеотиду (S5) и дуплексу (S5)+(S9) интенсивность флуоресценции умень-

шается в отсутствие ICP8 и АТФ (рис. 3). Это может быть связано с непосредственным взаимодействием между хеликазой и флуоресцентной меткой или является следствием изменений в структуре дуплекса и олигонуклеотида при связывании с хеликазой. Более протяженный дуплекс образуется при отжиге олигонуклеотидов (S3) и (S6). На рис. 3 представлены спектры флуоресценции дуплекса (S5)+(S9) и однотяжевого олигонуклеотида (S5) в отсутствие и в



**Рис. 3.** Спектры флуоресценции дуплекса (S5)+(S9) (кривая 1) и его комплекса с хеликазой UL9 (кривая 2), а также спектры флуоресценции свободного олигонуклеотида (S5) (кривая 3) и комплекса олигонуклеотида (S5) с хеликазой (кривая 4). Длина волны возбуждения 510 нм, щели для возбуждения и эмиссии равны 10 и 5 нм соответственно. Концентрации дуплекса (S5)+(S9) и олигонуклеотида (S5) равны  $2 \cdot 10^{-7}$  М. Концентрация димеров хеликазы равна  $6,3 \cdot 10^{-7}$  М. Условия: 20 мМ трис-НСl (рН 7,2), 12 мМ  $MgCl_2$ , 10% глицерин, 0,01% тритон X-100, 1 мМ дитиотриэтол.

присутствии хеликазы UL9. Кривые 1 и 2 соответствуют спектрам флуоресценции дуплекса (S5)+(S9) в отсутствие и в присутствии хеликазы UL9. Кривые 3 и 4 – спектры флуоресценции свободного олигонуклеотида (S5) и его комплекса с хеликазой соответственно.

Значительное тушение наблюдается для свободного одностежкового олигонуклеотида (S5) и его комплекса с хеликазой. По нашим данным, хеликаза UL9 образует более прочный комплекс с одностежковым 63-членным олигонуклеотидом (S1), чем с минимальным дуплексом (S1)+(S2) (константы связывания различаются примерно в 10 раз) [20]. Это различие в средстве хеликазы к дуплексу (S1)+(S2) и одностежковому олигонуклеотиду (S1) является основной причиной для наблюдаемого при связывании хеликазы с дуплексами (S1)+(S2) и (S5)+(S9) структурного перехода, который приводит к дестабилизации и частичному раскручиванию дуплексов. Ранее нами было показано, что при инкубации хеликазы UL9 с дуплексом (S1)+(S2) в течение 60 мин при  $42^\circ\text{C}$  в присутствии  $5 \cdot 10^{-3}$  М АТФ появляется продукт, подвижность которого в полиакриламидном геле соответствует подвижности комплекса одностежкового олигонуклеоти-

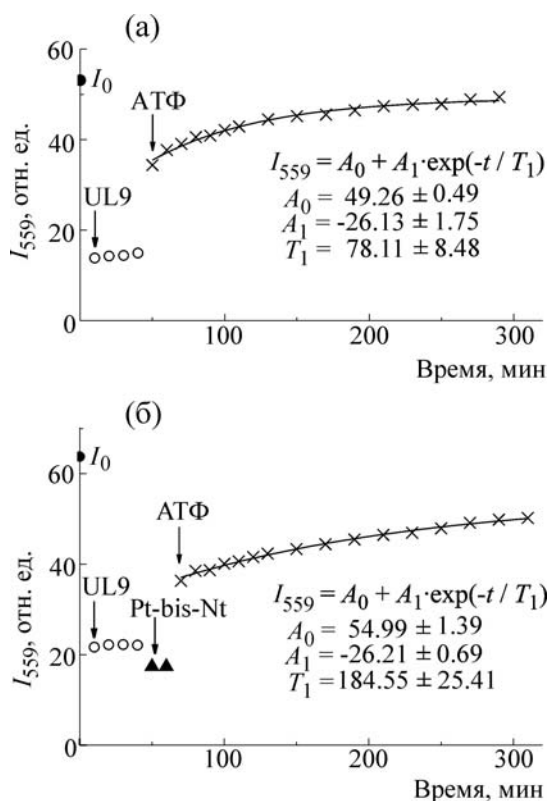
да с хеликазой UL9 [20]. Комплексы олигонуклеотидов (S1) и (S2) с хеликазой имеют одинаковые подвижности в полиакриламидном геле. Обратная реакция – образование дуплекса из одностежковых олигонуклеотидов – затруднена, так как олигонуклеотиды (S1) и (S2) образуют шпильки, с которыми связывается хеликаза UL9.

**Раскручивание хеликазой UL9 АТ-богатой шпильки в олигонуклеотиде (S5) в отсутствие и в присутствии Pt-бис-нетропсина.** При добавлении АТФ к смеси, содержащей одностежковый олигонуклеотид (S5) и хеликазу UL9, наблюдаются зависящие от времени изменения интенсивности флуоресценции донора, свидетельствующие о раскручивании хеликазой АТ-богатой шпильки, что приводит к увеличению среднего расстояния между флуоресцентными зондами. На рис. 4 представлена зависимость от времени интенсивности флуоресценции олигонуклеотида (S5) при 559 нм после добавления хеликазы UL9 и АТФ в отсутствие (а) и в присутствии Pt-bis-Nt (б).

Экспериментальные зависимости интенсивности флуоресценции от времени хорошо описываются уравнением

$$I_{559}(t) = A_0 + A_1 \exp(-t/T_1). \quad (3)$$

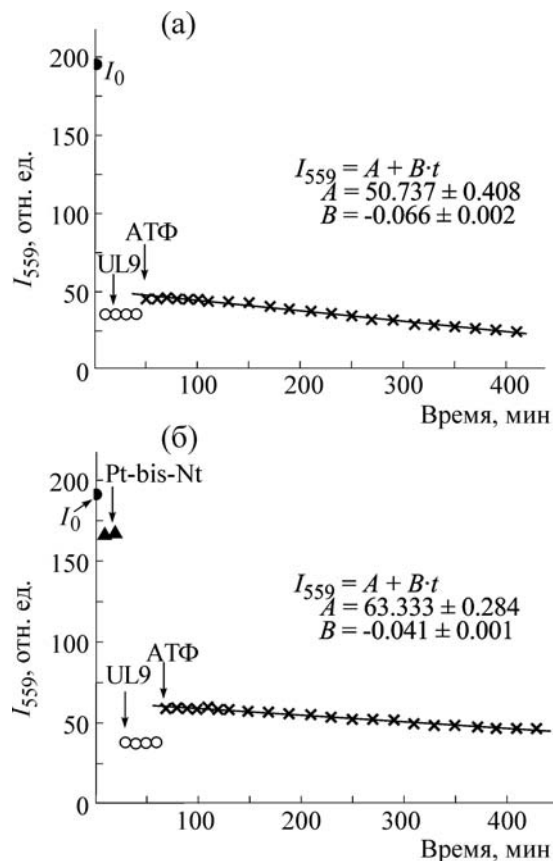
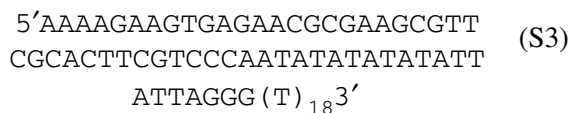
Здесь  $I_{559}(t)$  – интенсивность флуоресценции комплексов олигонуклеотида с хеликазой в отсутствие или в присутствии Pt-bis-Nt,  $t$  – время, которое отсчитывается от момента добавления в исследуемый раствор АТФ,  $T_1$  – характерное время для исследуемого процесса,  $A_0$  и  $A_1$  – константы. Сплошные кривые на рис. 4 – это теоретические зависимости  $I_{559}(t)$ , для которых сумма квадратов отклонений экспериментальных точек от рассчитанных значений  $I_{559}(t)$  достигает минимума. На рис. 4 указаны значения величин  $A_0$ ,  $A_1$  и  $T_1$ , которые удовлетворяют этому критерию. Форма кривых, представленных на рис. 4, свидетельствует о том, что Pt-bis-Nt замедляет раскручивание АТ-богатой шпильки хеликазой UL9. Среднее значение  $T_1$  по данным трех независимых экспериментов составляет  $169,57 \pm 22,70$  мин, в то время как в отсутствие Pt-bis-Nt среднее значение  $T_1$  по данным трех независимых экспериментов равно  $113,54 \pm 14,70$  мин. Это различие в средних значениях  $T_1$  является количественной мерой того, насколько уменьшается скорость хеликазной реакции в присутствии Pt-бис-нетропсина. Уменьшение скорости раскручивания ДНК связано с образованием комплекса Pt-bis-Nt с АТ-богатой шпилькой. Ранее было показано, что Pt-bis-Nt увеличивает термостабильность АТ-бо-



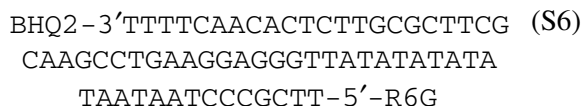
**Рис. 4.** Кинетика раскручивания АТ-богатой шпильки в олигонуклеотиде (S5) хеликазой UL9 в отсутствие (а) и в присутствии Pt-бис-нетропсина (б).  $I_0$  – интенсивность флуоресценции свободного олигонуклеотида при 559 нм. Длина волны возбуждения – 510 нм, щели для эмиссии и возбуждения равны 10 и 5 нм соответственно. Стрелками указаны моменты времени, когда к раствору олигонуклеотида (S5) были добавлены хеликаза UL9, Pt-bis-Nt и АТФ. Концентрации АТФ, олигонуклеотида (S5) и хеликазы в реакционной смеси равны  $1,8 \cdot 10^{-2}$ ;  $1,1 \cdot 10^{-7}$  и  $3,9 \cdot 10^{-7}$  М соответственно. Концентрация Pt-bis-Nt равна  $1,98 \cdot 10^{-7}$  М. Условия: 20 мМ трис-HCl (рН 7,2), 12 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10% глицерин, 0,01% тритон X-100, 1 мМ дитиотриэтол, 37°C.

гатой шпильки при связывании (температура плавления увеличивается примерно на 20°C) [17]. 15Lys-bis-Nt и Lys-bis-Nt также увеличивают температуру плавления АТ-богатой шпильки [20].

**Раскручивание хеликазой UL9 двуспиральных олигонуклеотидов в отсутствие и в присутствии Pt-бис-нетропсина.** Олигонуклеотиды (S3) и (S6) способны образовывать дуплекс, в котором нижняя нить содержит флуоресцентные зонды R6G и BHQ2 на 5'- и 3'-концах.



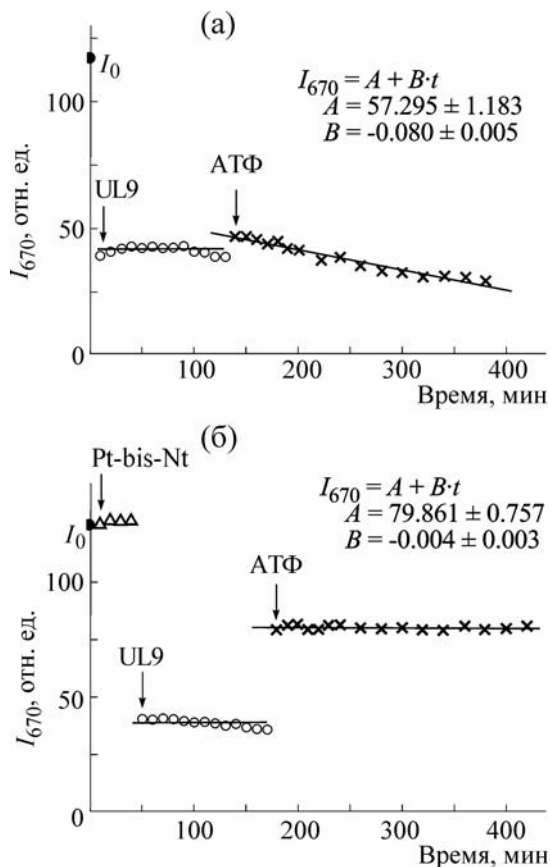
**Рис. 5.** Раскручивание двуспиральной ДНК хеликазой UL9 в отсутствие (а) и в присутствии в реакционной смеси Pt-бис-нетропсина (б).  $I_0$  – интенсивность флуоресценции свободного дуплекса (S3)+(S6) при 559 нм. Длина волны возбуждения – 510 нм, щели для эмиссии и возбуждения равны 10 и 5 нм соответственно. Концентрации АТФ и дуплекса (S3)+(S6) и хеликазы в реакционной смеси равны  $1,8 \cdot 10^{-2}$ ;  $1,1 \cdot 10^{-7}$  и  $3,9 \cdot 10^{-7}$  М соответственно. Концентрация Pt-bis-Nt равна  $8,9 \cdot 10^{-7}$  М. Сплошными линиями показаны теоретически рассчитанные зависимости  $I_{559}(t)$ , для которых сумма квадратов отклонений экспериментальных точек от рассчитанных значений  $I_{559}(t)$  является минимальной. Условия указаны в подписи к рис. 4.



На рис. 5 представлены зависимости от времени интенсивности флуоресценции комплекса хеликазы с дуплексом (S3)+(S6) после добавления АТФ в отсутствие (а) и в присутствии Pt-бис-нетропсина (б).

Как видно из рис. 5, интенсивность флуоресценции  $I_{559}(t)$  комплексов хеликазы с дуплексом в присутствии АТФ линейно зависит от времени инкубации реакционной смеси. В ходе реакции появляется свободный олигонук-



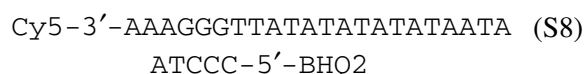
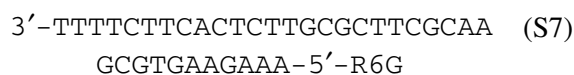
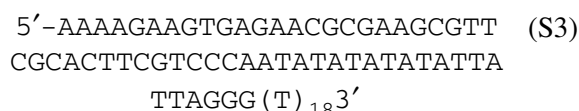


**Рис. 6.** Раскручивание ДНК в олимере (S3)+(S7)+(S8) в отсутствие (а) и в присутствии в реакционной смеси Pt-bis-Nt (б).  $I_0$  – интенсивность флуоресценции свободного олигомера (S3)+(S7)+(S8) при 670 нм. Длина волны возбуждения – 620 нм, щели для эмиссии и возбуждения равны 10 и 5 нм соответственно. Концентрации АТФ, олигомера (S3)+(S7)+(S8) и хеликазы в реакционной смеси равны  $1,8 \cdot 10^{-2}$ ;  $1,1 \cdot 10^{-7}$  и  $3,97 \cdot 10^{-7}$  М соответственно (а) и  $1,9 \cdot 10^{-2}$ ;  $1,15 \cdot 10^{-7}$  и  $3,44 \cdot 10^{-7}$  М соответственно (б). Концентрация Pt-bis-Nt равна  $1,4 \cdot 10^{-7}$  М. Сплошными линиями показаны зависимости  $I_{670}(t)$ , которые дают наилучшее соответствие с экспериментальными данными. Условия указаны в подписи к рис. 4.

леотид (S6), который спонтанно сворачивается в шпильку и может связываться с хеликазой. Так как средние расстояния между донором и акцептором в шпильке меньше, чем в дуплексе (S3)+(S6), то уменьшение интенсивности флуоресценции при 559 нм отражает увеличение концентрации свободного олигонуклеотида (S6) в реакционной смеси. Как видно из рис. 5, наклон прямой  $I_{559}(t)$  для системы, в которой присутствует Pt-bis-Nt, в 1,5 раза меньше, чем наклон прямой в контроле, т.е. в отсутствие Pt-bis-нетропсина в реакционной смеси. Таким образом, Pt-bis-нетропсин при связывании с

OriS уменьшает скорость раскручивания дуплекса (S3)+(S6) хеликазой UL9.

Эти результаты подтверждаются экспериментальными данными, полученными для олигомера (S3)+(S7)+(S8). Этот олигомер отличается от дуплекса (S3)+(S6) тем, что в нем вместо нижней нити дуплекса используются два флуоресцентно-меченых олигонуклеотида (S7) и (S8). После отжига олигонуклеотидов (S3), (S7) и (S8) верхняя нить в олимере содержит неструктурированный односторонний хвост из 18 остатков тимина на 3'-конце.



Здесь Cu5 – аналог цианинового красителя Cu5, BHQ2 – тушитель флуоресценции BHQ2 (Black hole 2 quencher). Флуоресцентные зонды присоединены к 3'- и 5'-концам олигонуклеотида (S8). Олигонуклеотид (S7) несет флуоресцентный зонд (R6G) на 5'-конце.

Измерение интенсивности флуоресценции при 670 нм,  $I_{670}(t)$ , после добавления хеликазы и АТФ позволяет исследовать кинетику раскручивания ДНК в олимере (S3)+(S7)+(S8) хеликазой UL9. Из рис. 6 видно, что в отсутствие Pt-бис-нетропсина в реакционной смеси наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции при 670 нм, которое вызвано раскручиванием ДНК и связано с диссоциацией олигонуклеотида (S8) и стабилизацией его структуры в форме шпильки. Обратная реакция – ассоциация олигонуклеотидов и образование олигомера (S3)+(S7)+(S8) – затруднена, так как свободные олигонуклеотиды (S7) и (S8) содержат палиндромные последовательности и сворачиваются в шпильки, с которыми связывается хеликаза. В присутствии Pt-бис-нетропсина в реакционной смеси (молярное отношение бис-нетропсина к олимеру ДНК равно 1,2) процесс раскручивания хеликазой олигомера (S3)+(S7)+(S8) практически полностью ингибирован (рис. 6б). Мы также обнаружили, что Pt-бис-нетропсин замедляет раскручивание АТ-богатой шпильки в олигонуклеотиде (S5) и препятствует образованию протяженного неструктурированного хвоста на 3'-конце олигонукле-

тида. Это приводит к подавлению инициации репликации вирусной ДНК.

Данные ДНКазного футпринтинга показывают, что Pt-бис-нетропсин избирательно связывается с А+Т-кластером в OriS. Pt\*-bis-Nt и малоактивные аналоги нетропсина обладают меньшим сродством к А+Т-кластеру, чем Pt-бис-нетропсин (константа связывания Pt-бис-нетропсина ( $\approx 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) в 10 (или более) раз превосходит константу связывания Pt\*-bis-Nt). 15Lys-bis-Nt, Pt-bis-Nt и Lys-bis-Nt обладают высокой противогерпесной активностью в культуре клеток Vero E6 ( $IC_{50}$  равно 1,3; 4,4 и 11,6 мМ, а индексы селективности (SI) равны 47, 59 и 29 для 15Lys-bis-Nt, Pt-bis-Nt и Lys-bis-Nt соответственно. Pt\*-bis-Nt практически не обладает противовирусной активностью в культуре клеток Vero E6, инфицированных вирусом простого герпеса первого типа ( $SI \approx 0$ ) [5,20]. Бис-нетропсины, обладающие высокой противовирусной активностью (15Lys-bis-Nt, Pt-bis-Nt и Lys-bis-Nt) при связывании с А+Т-кластером в OriS увеличивают температуру плавления А+Т-кластера и ингибируют процесс флукуационного раскрытия АТ-пар оснований, который необходим для инициации раскручивания ДНК хеликазой UL9.

**Противовирусная активность бис-нетропсинов.** Исследована антивирусная активность димерных аналогов нетропсина в культуре клеток Vero E6 и изучено лечебное действие 15 Lys-bis-Nt и Lys-bis-Nt на инфицированных лабораторных животных при внутрибрюшинном введении субстанций (мыши Balb/с) и при их использовании в форме лечебной мази для лечения кожной герпетической инфекции у морских свинок. Показано, что при внутрибрюшинном введении лабораторным животным 15Lys-bis-Nt (разовая доза 30 мг на килограмм массы животного, бис-нетропсин вводился два раза в сутки в течение пяти суток после начала инфекции) наблюдается 45% уменьшение смертности животных при 60% смертности в контрольной инфицированной, но нелеченной группе животных [25]. Бис-нетропсины подавляют репродукцию вариантов вируса с лекарственной устойчивостью.

Исследован лечебный эффект 15Lys-bis-Nt и Lys-bis-Nt при подавлении кожной вирусной инфекции у морских свинок, вызванной вирусом герпеса человека. В этих экспериментах 15Lys-bis-Nt и Lys-bis-Nt использовались в виде 0,075 и 0,15% мазей на основе полиэтиленгликоля. Раствор, содержащий вирус с титром 7 lg БОЕ/мл, втирался в депилированные скарифицированные участки кожи животных площадью около 5 см<sup>2</sup>. Мазь наносилась спустя 48

ч после инфицирования животного на пораженный участок поверхности тела животного два раза в сутки в течение пяти суток. В контроле через 4 сут после инфицирования возникали герпетические высыпания. Через пять суток проявления симптомов заболевания достигали максимального развития. Ярко выраженный лечебный эффект наблюдался для каждого из используемых бис-нетропсинов при применении в виде 0,15% мазей на основе полиэтиленгликоля. Наблюдалось уменьшение площади пораженной поверхности тела животного, уменьшалось количество везикулярных герпетических высыпаний по сравнению с контролем. Полная реэпителизация наступала на сутки быстрее, чем в контроле. Для получения аналогичного лечебного эффекта при применении ацикловира приходилось использовать 5% мазь, содержащую в 30 раз большее количество лекарственного агента [26]. Сравнительное изучение эффективности лечебного действия бис-нетропсинов и ацикловира в опытах *in vivo* показало, что использование Lys-bis-Nt и 15Lys-bis-Nt в виде мазевой лекарственной формы является более эффективным воздействием на кожную герпетическую инфекцию, чем применение ацикловира. Особенную ценность димерные производные нетропсина представляют для подавления инфекции, вызванной вариантами вируса герпеса с лекарственной устойчивостью к ацикловиру, когда оральное применение ацикловира и применение в форме мази оказываются неэффективными.

Авторы благодарят А.Б. Полтарауса и его группу за секвенирование клонированных фрагментов ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии и Российского фонда фундаментальных исследований (грант 11-04-02001).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. R. Singleton, M. S. Dillingham, and D. B. Wigley, *Ann. Rev. Biochem.* **76**, 23 (2007).
2. J. W. Lown, K. Krowicki, J. Balzarini, et al., *J. Med. Chem.* **32**, 2368 (1989).
3. В. Л. Андропова, С. Л. Гроховский, А. Н. Суrowая и др., Докл. АН РАН. Биохим. Биофиз. **380**, 345 (2001).
4. В. Л. Андропова, С. Л. Гроховский, А. Н. Суrowая и др., Докл. АН РАН. Биохим. Биофиз. **399**, 829 (2004).
5. В. Л. Андропова, С. Л. Гроховский, А. Н. Суrowая и др., Докл. АН РАН. Биохим. Биофиз. **422**, 688 (2008).

6. В. Л. Андропова, С. Л. Гроховский, А. Н. Суrowая и др., Докл. АН РАН. Биохим. Биофиз. **413**, 830 (2007).
7. P. D. Olivio, N. J. Nelson, and M. D. Challberg, J. Virol. **63**, 196 (1989).
8. P. E. Bohmer, M. S. Dodson, and I. R. Lehman, J. Biol. Chem. **268**, 1220 (1993).
9. L. Murata and M. S. Dodson, J. Biol. Chem. **274**, 37079 (1999).
10. E. C. Stabel and P. D. Olivo, Nucl. Acids Res. **21**, 5203 (1993).
11. A. Koff, J. F. Schwedes, and P. J. Tegtmeyer, J. Virol. **65**, 3284 (1991).
12. S. S.-K. Lee and I. R. Lehman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 2838 (1997).
13. X. He and I. R. Lehman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 3024 (2001).
14. A. Aslani, B. Macao, S. Simonsson, and P. Elias, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 7194 (2001).
15. A. Aslani, M. Olsson, and Per Elias, J. Biol. Chem. **277**, 41204 (2002).
16. В. Macao, M. Olsson, and Per Elias, J. Biol. Chem. **279**, 29211 (2004).
17. А. Н. Суrowая, С. Л. Гроховский, Н. П. Бажулина и Г. В. Гурский, Биофизика **53**, 744 (2008).
18. A. N. Surovaya, G. Burckhardt, S. L. Grokhovsky, et al., J. Biomol. Struct. Dyn. **18**, 689 (2001).
19. G. V. Gursky, S. L. Grokhovsky, A. N. Surovaya, et al., J. Biomol. Struct. Dyn. **26**, 895 (2009).
20. А. Н. Суrowая, С. Л. Гроховский, Я. Г. Гурский и др., Биофизика **55**, 230 (2010).
21. С. Л. Гроховский, А. Л. Жузе и Б. П. Готтих, Биоорган. химия **18**, 570 (1992).
22. S. L. Grokhovsky, A. N. Surovaya, G. Burkhardt, et al., FEBS Lett. **439**, 346 (1998).
23. J. Sambrook; E. F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989).
24. Th. Forster, Ann. Phys. (Leipzig) **2**, 55 (1948).
25. В. Л. Андропова, С. Л. Гроховский, П. Г. Дерябин и др., Вопр. вирусологии (в печати).
26. В. Л. Андропова, С. Л. Гроховский, А. Н. Суrowая и др., Вопр. вирусологии (в печати).

## Inhibition of Herpes Simplex Virus Helicase UL9 by Netropsin Derivatives and Antiviral Activities of Bis-Netropsins

**N.P. Bazhulina\***, **A.N. Surovaya\***, **Ya.G. Gursky\*\***, **V.L. Andronova\*\*\***, **V.S. Arkhipova\***, **M.V. Golovkin\***, **A.M. Nikitin\***, **G.A. Galegov\*\*\***, **S.L. Grokhovsky\***, and **G.V. Gursky\***

\*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

\*\*Scientific and Technological Cardiology Complex, Moscow, 121552 Russia

\*\*\*Ivanovsky Research Institute of Virology, Moscow, 123098 Russia

Data obtained show that antiviral activities of bis-linked netropsin derivatives are targeted by specific complexes formed by helicase UL9 of herpes simplex virus type 1 with viral DNA replication origins, represented by two OriS sites and one OriL site. According to the results of footprinting studies bis-netropsins get bound selectively to an A+T-cluster which separates interaction sites I and II for helicase UL9 in OriS. Upon binding to DNA bis-netropsins stabilize a structure of the A+T-cluster and inhibit thermal fluctuation-induced opening of AT- base pairs which is needed for local unwinding of DNA by helicase UL9. Kinetics of ATP-dependent DNA unwinding in the presence and absence of Pt-bis-netropsin are studied by measuring the efficiency of Forster resonance energy transfer (FRET) between the fluorescent probes attached covalently to 3'- and 5'-ends of the oligonucleotides in the minimal OriS duplex. Pt-bis-netropsin and related molecules inhibit unwinding of OriS duplex by helicase UL9. Pt-bis-netropsin is also able to reduce the rate of unwinding of the AT- rich hairpin formed by the upper strand in the minimal OriS duplex. The antiviral activities and toxicity of bis-linked netropsin derivatives are studied in cell cultured experiments and experiments with animals infected by herpes virus.

*Key words: bis-linked netropsin derivatives, footprinting, herpes simplex virus type 1, helicase UL9, FRET method, DNA unwinding, antiviral activity*