

УДК 577.156; 577.151.64

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ КЛЕТОЧНЫХ РЕПОРТЕРОВ НА ОСНОВЕ ФЬЮЖЕН-БЕЛКОВ ЛЮЦИФЕРАЗЫ

А.Ю. Христиченко¹, А.А. Полозников¹, Д.М. Хушпульян¹, Н.А. Смирнова¹,
А.А. Захарянц², С.В. Казаков³, В.И. Тишков^{2,4,5,*}, И.Г. Газарян^{1,2,4}

(¹ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; ²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; ³ Колледж Дайсона университета Пейса, кафедра химии и физических наук; ⁴Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет; ⁵Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; *e-mail: vitishkov@gmail.com)

Клеточные репортеры на основе экспрессии слитых белков люциферазы с доменами транскрипционных факторов, ответственных за их стабильность, представляют собой микробиореакторы, позволяющие напрямую следить за судьбой транскрипционного фактора (или его домена), меченного люциферазой, в реальном времени. Для понимания принципиальных возможностей и ограничений данных систем при использовании в прикладных и фундаментальных исследованиях необходима разработка количественного описания их действия, которая предполагает расчет/измерение действующей внутриклеточной концентрации слитых белков и скорость их наработки. В данной работе на основе экспериментальных данных рассчитана внутриклеточная концентрация фьюжен-белков люциферазы в стационарном состоянии в линиях нейробластомы SH-SY5Y, стабильно экспрессирующих слитые белки-репортеры HIF1 ODD-luc и Neh2-luc, методом калибрования по люциферазной активности. Показано, что в обоих случаях концентрация слитых белков люциферазы составляет порядка 60–80 нМ, что близко к значениям как константы Михаэлиса (10–100 нМ HIF) для HIF пролил гидроксилазы, так и константы диссоциации комплекса Keap1–Nrf2 (50 нМ) (параметров, контролирующей скорость-лимитирующие стадии действия репортеров HIF1 ODD-luc и Neh2-luc соответственно). Новые данные дают возможность оценить скорость наработки и максимально достижимую концентрацию фьюжен-белков в условиях их стабилизации. Это позволяет предложить количественную схему действия репортера Neh2-luc для объяснения значительного сдвига кажущихся параметров активации по сравнению с истинными константами диссоциации, определяемыми для известных активаторов «вытеснения» в гомогенном анализе методом поляризации флуоресценции с использованием рекомбинантного Keap1 и меченого Nrf2 пептида.

Ключевые слова: Nrf2, Keap1, HIF пролилгидроксилаза, бардоксолон, андрографолид, активаторы вытеснения.

Список использованных в статье сокращений: HIF (hypoxia inducible factor) – фактор, индуцируемый гипоксией, HIF PHD – HIF-пролилгидроксилаза, BD – бардоксолон, AG – андрографолид.

Экспрессия белков и ферментов антиоксидантной защиты регулируется на транскрипционном уровне за счет активации участка ARE (antioxidant respond element) в промоторах соответствующих генов, с которым связываются транскрипционные факторы семейства NF-E2 (nuclear factor erythroid-derived 2), главный из которых Nrf2 [1–3]. Транскрипционный фактор Nrf2 известен как «мастер-регулятор» антиоксидантного ответа, запускающий экспрессию таких ферментов антиоксидантной защиты, как

NAD(P)H: хиноноксидоредуктаза 1, гемоксигеназа 1, глутатионтрансфераза, глутататцистеинлигаза, и многие другие [1–3]. Без воздействия электрофильных соединений и в отсутствие окислительного стресса транскрипционный фактор Nrf2 связывается белком-регулятором Keap1, входящим в убиквитинлигазный комплекс Cul3–Rbx1–E3, который обеспечивает убиквитинирование Nrf2 [4–7], приводящее к последующей протеасомной деградации. В области разработки новых активаторов Nrf2 в по-

следнее десятилетие наибольший интерес вызывают «неэлектрофильные» активаторы, работающие по принципу конкуретного вытеснения Nrf2 из комплекса с Keap1 [8].

Были сделаны неудачные попытки некоторых академических групп и компаний разработать эффективный наномолярный активатор Nrf2, действующий по механизму вытеснения его из комплекса с Keap1, а именно, наблюдался сдвиг констант активации в биологических и клеточных системах на несколько порядков в область высоких микромолярных концентраций при наномолярных значениях констант диссоциации, полученных *in vitro* в гомогенном анализе с рекомбинантным Keap1 и флуоресцентно меченным Nrf2 пептидом [8]. В результате назрела необходимость проведения

хотя бы полуколичественного исследования на клеточном уровне для оценки принципиальных ограничений при создании эффективных «активаторов вытеснения».

Транскрипционный фактор Nrf2 состоит из 605 аминокислот и подразделяется на 7 функциональных доменов, в число которых входит Neh2-домен, взаимодействующий с Kelch-доменом Keap1 [4–7] (рис. 1). Keap1 представляет собой редокс-сенсор, имеет в структуре 22 остатка цистеина и образует димер, в котором Neh2-домен растягивается между двумя Kelch-доменами для доступа убиквитинлигазы к остаткам лизина Neh2. Структура димера, как и область связывания с убиквитинлигазой (Cys151 Keap1), чувствительна к окислительной или химической модификации активных

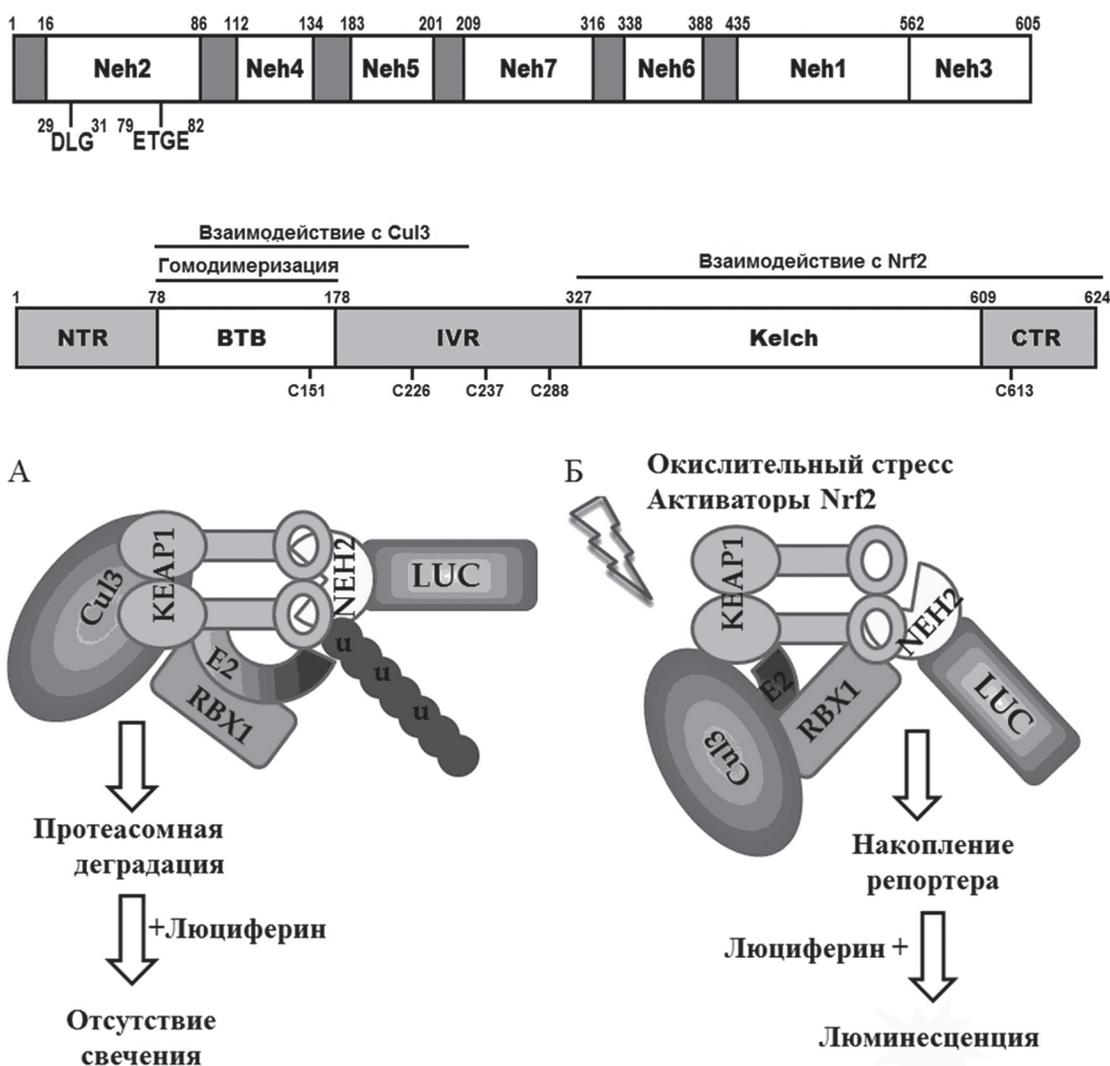


Рис. 1. Схема доменного строения белков Nrf2 и Keap1; схема действия репортера Neh2-luc в отсутствие (А) и в присутствии (Б) активаторов Nrf2

остатков цистеина Keap1 [4–7]. Разрушение структуры комплекса, как и конкурентное вытеснение Neh2 (например, под действием физиологического активатора р62 [9]), приводит к стабилизации Nrf2 и запуску антиоксидантной программы.

Для изучения действия активаторов антиоксидантной защиты авторами был ранее сконструирован и охарактеризован фьюжен-репортер Neh2-luc, действие которого аналогично эндогенной регуляции Nrf2 (рис. 1) [10]. В клетке, как в био-реакторе, с постоянной скоростью синтезируется фьюжен-белок Neh2-luc, который связывается с Keap1, убиквитинируется и подвергается протеасомной деградации [10]. Под действием активаторов Nrf2 разной природы комплекс распадается и фьюжен-белок стабилизируется, что проявляется в виде возрастающего люминесцентного сигнала. В данной работе были проведены измерения и расчеты внутриклеточной концентрации слитого белка-репортера, а также скорости его наработки и предложена количественная схема действия Neh2-luc.

Материалы и методы

Реактивы. В работе использовали самые мощные из известных алкилирующих активаторов Nrf2 – бардоксолон (BD) и андрографолид (AG), а также N,N'-(нафталин-1,4-диил)бис(4-метоксибензсульфонамид) (NMBSA) – коммерчески доступный активатор, работающий по механизму вытеснения. Растворы активаторов (10 мМ) готовили в диметилсульфоксиде и непосредственно перед измерением проводили их разбавление также диметилсульфоксидом в желаемом диапазоне концентраций ($\times 50$) для последующего добавления 2 мкл аликвот к 200 мкл среды в лунке. Рекombинантную люциферазу светляков (1 мг) использовали для приготовления 20 мкМ раствора в 5 мМ Трис-НСl-буфере (рН 7,4) непосредственно перед экспериментом. Все химические реактивы были приобретены у фирмы «Sigma-Aldrich» (США), за исключением реактивов для работы с клеточными культурами («Gibco», США), а также буфера для лизиса клеток и люциферазного реагента BrightGlo™ («Promega», США).

Определение внутриклеточной концентрации слитых белков HIF1 ODD-luc и Neh2-luc. Использовали нетрансформированную клеточную линию нейробластомы человека SH-SY5Y и линии, стабильно экспрессирующие репортеры HIF1 ODD-luc [11] или Neh2-luc [10]. Клетки культивировали до полной конfluence

в 5 мл среды, затем в 2 раза разбавляли средой для культивирования DMEM/F12+GlutaMAX («Gibco», США), засекали по 100 мкл в стерильные белые 96-луночные микропланшеты с прозрачным дном и дополнительно культивировали при 37 °С в присутствии 5% CO₂ в течение 16 ч или дольше до достижения полной конfluence (визуальная оценка под микроскопом). Затем отбирали среду и добавляли 20 мкл лизис-буфера («Promega», США), в которую в случае нетрансформированной линии клеток вносили 2 мкл раствора рекombинантной люциферазы светляков в диапазоне от 1 пг до 10 нг на лунку, инкубировали 7 мин и измеряли активность после добавления 80 мкл люциферазного реагента. Одновременно на том же микропланшете проводили измерение стационарного сигнала после лизиса соответствующих репортерных линий при спайкинге возрастающими концентрациями рекombинантной люциферазы (от нуля до 10 мкМ в пересчете на внутриклеточную концентрацию) на спектрофотометре «SpectraMax M5e» («Molecular Devices», США). Для измерения люциферазной активности было необходимо подкладывать белый экран под микропланшет, поскольку для подсчета клеток использовали белые микропланшеты с прозрачным дном.

Оценка скорости наработки репортера Neh2-luc. Для оценки скорости использовали необратимые активаторы – бардоксолон и андрографолид. Для иллюстрации сдвига эффективной биологической концентрации полуактивации на порядки по сравнению с истинной константой диссоциации использовали известный обратимый активатор NMBSA (действующий по механизму вытеснения), любезно предоставленный докт. И.Н. Гайсиной (университет Иллинойса, г. Чикаго). Кинетику действия активаторов снимали по точкам, как описано нами ранее [10, 11].

Результаты и обсуждение

Внутриклеточная стационарная концентрация слитых белков. При определении внутриклеточной концентрации методом измерения люциферазной активности принципиальны два момента: а) соответствие специфической активности рекombинантной люциферазы и слитого белка; б) объем клеток в лунке. Известно, что площадь поверхности лунки 96-луночного микропланшета составляет 0,3 см². С учетом моно-слоя покрытия и толщины клетки нейробластомы в 3 мк, объем клеточной массы при полной конfluence составляет 0,09 мкл. Измерение

люциферазной активности внутри клетки происходит после 7 мин инкубации клеток в 20 мкл лизисного буфера, что должно приводить к существенной инактивации фермента, а это, вероятно, не принималось во внимание в работе [11]. В данной работе рекомбинантную люциферазу добавляли к лизируемым клеткам нетрансформированной нейробластомы и инкубировали в лизисном буфере 7 мин одновременно с инкубацией клеток репортерных линий. Количество люциферазы (ось абсцисс на рис. 2) пересчитали на внутриклеточную концентрацию (объем клеток принят равным 0,09 мкл). Как показано на рис. 2, по сравнению с калибровочной кривой для люциферазы в отсутствие обработки лизисным буфером, применяемая обработка клеток в течение 7 мин вызывает 70%-ю инактивацию фермента. При этом минимально определяемое количество люциферазы на лунку вследствие инактивации составляет порядка 10 пг. В данном эксперименте стационарный сигнал измерялся в четырех повторах, одновременно был проведен эксперимент с пиковым содержанием люциферазы в репортерных линиях, как показано на рис. 2. Хорошо видно, что только при концентрации люциферазы порядка 80 нМ наблюдается удвоение сигнала в репортерных линиях. Довольно любопытно, что уровень стационарного сигнала для конфлюэнтных линий обоих репортеров практически неразличим в пределах ошибки эксперимента и составляет порядка 60–80 нМ. В предыдущих работах стационарную концентрацию белка-репортера Neh2-luc оценивали приблизительно в 2 раза ниже, чем стационарную концентрацию

HIF ODD-luc [10, 11], принимая размеры клеток репортерных линий одинаковыми, что на самом деле не соответствует действительности. Репортерные линии по размеру клеток различаются не только между собой, но отличаются и от исходной нетрансформированной линии нейробластомы (результаты не показаны). С учетом новых данных по стационарному уровню сверхэкспрессируемых слитых белков в репортерных линиях можно говорить об активации соответствующих сигнальных путей за счет предохранения от деградации данных эндогенных транскрипционных факторов. Это запускает контролируемые ими программы выживания, что изменяет размеры и форму клетки, а также увеличивает наблюдаемую экспериментально жизнеспособность клеточных репортеров по сравнению с исходной линией нейробластомы.

Репортер Neh2-luc действует по тому же принципу, что и репортер HIF1 ODD-luc, оптимизированный нами для проведения скрининга ингибиторов фермента HIF пролилгидроксилазы и использованный в серии работ [11–14]. Стабильность транскрипционного фактора HIF (hypoxia inducible factor) регулируется α -кетоглутарат-зависимыми негеминовыми диоксигеназами – HIF-пролилгидроксилазой (PHD) и аспарагингидроксилазой [15]. Стадия, катализируемая HIF PHD, лимитирует скорость всего многоступенчатого процесса, приводящего к протеасомной деградации HIF [11]. Домен HIF ODD, включающий Pro564, представляет собой субстрат HIF PHD: при гидроксировании Pro564 весь слитый белок убиквитинируется и подвергается протеасомной деградации. В отсутствие ингибиторов фермента в стационарном состоянии люминесцентный сигнал репортера минимален и соответствует равновесной концентрации фьюжен-белка. Оценку его равновесной концентрации (2,3 нМ) [11] проводили путем калибровки по рекомбинантной люциферазе в расчете на 30 тыс. клеток репортера, принимая объем клетки равным 233 мк³. Экспериментальные данные, полученные с использованием репортера HIF ODD-luc для обратимых ингибиторов фермента, регулярно демонстрируют кажущиеся константы на порядки хуже, чем константы ингибирования в гомогенном анализе *in vitro*. В случае ингибиторов фермента, конкурирующих с α -кетоглутаратом, это можно объяснить его высокой (миллимолярной) внутриклеточной концентрацией [13], но в случае адаптаина и его оптимизированных аналогов, не конкурирующих

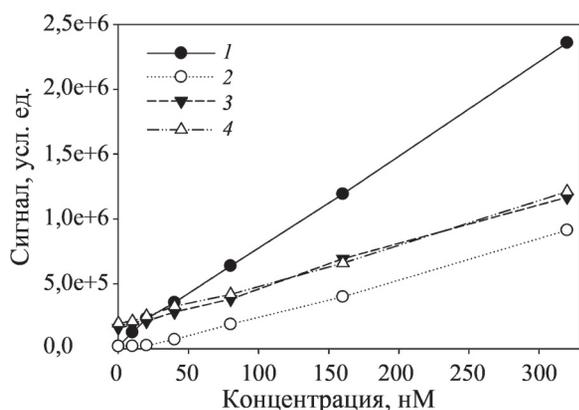


Рис. 2. Определение стационарной внутриклеточной концентрации фьюжен-белков Neh2-luc и HIF ODD-luc: 1 – калибровочная кривая в отсутствие лизисного буфера, 2 – калибровочная кривая при лизисе клеток нетрансформированной линии нейробластомы, 3 – спайкинг люциферазы в репортере Neh2-luc, 4 – спайкинг люциферазы в репортере HIF ODD-luc

с α -кетоглутаратом за связывание с ферментом и имеющих константу диссоциации комплексов с железом в растворе порядка 100–200 нМ, сдвиг константы активации репортера на порядок (до микромолярных концентраций) объяснить трудно. Поэтому измерения и расчет стационарной концентрации слитых белков, проведенные в данной работе для обоих репортеров одновременно, позволяют уточнить количественные аспекты действия репортера HIF ODD-luc.

Скорость наработки белков-репортеров.

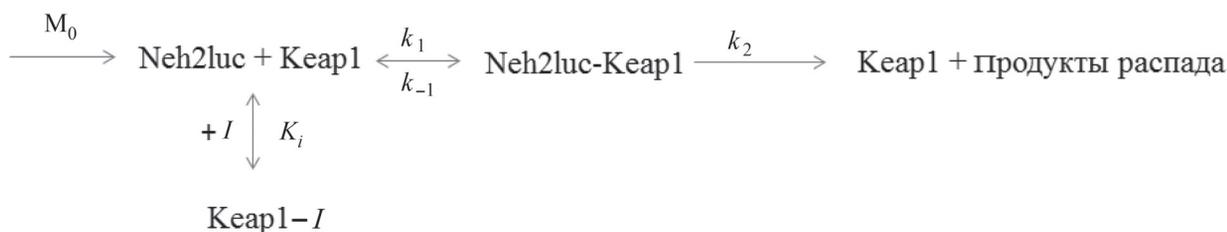
В обеих репортерных системах используется сильный конститутивный промотор цитомегаловируса (p_{cmv}), который в принципе должен обеспечивать одинаковую скорость наработки слитых белков [10, 11]. В связи с тем, что оценка стационарной концентрации репортера HIF ODD-luc при активации насыщающими концентрациями циклопирокса в работе [11] занижена в 25 раз, очевидно, что и оценка скорости их наработки занижена в той же пропорции: на самом деле она должна составлять порядка 7,5 нМ/мин, а максимальная концентрация накопленного белка-репортера в случае необратимого ингибирования превышает 1 мкМ. При этом, обратимые ингибиторы фермента, такие как адаптахин и его оптимизированные аналоги в насыщающей концентрации приводят к установлению равновесной концентрации около 0,5 мкМ. Пересчет приведенных авторами [11] данных не представляет труда, поскольку все результаты представлены в нормализованном виде по отношению к стационарной концентрации слитого белка. Новые данные принципиально не изменяют кинетическую схему действия репортера HIF ODD-luc, предложенную ранее в работе [11], но изменяют картину действия двойных репортеров фермент-субстрат, описанных в работе [13]. Экспрессия фермента с сильного промотора может генерировать близкие к микромолярным концентрации фермента, и система будет исходно функционировать в условиях избытка фермента над субстратом, что приведет к значительному увеличению кажущихся констант

активации даже для сильных и специфических ингибиторов HIF-пролилгидроксилазы, таких как адаптахин и его аналоги. Кроме того, можно ожидать, что такой избыток фермента в клетке приведет к полной деградации эндогенного HIF и соответственно негативно скажется на жизнеспособности репортерной линии на основе нейробластомы. Трудности с получением репортерной линии, стабильно экспрессирующей двойные конструкции фермент-субстрат, были отмечены в работе [13].

Максимальную скорость накопления репортера Neh2-luc рассчитывали по кинетике его активации (рис. 3) под действием сильных необратимых алкилирующих модификаторов – андрографолида (AG) и бардоксолона (BD). Как показано на рис. 3, в обоих случаях скорость синтеза репортера, регистрируемого по возрастанию люминесцентного сигнала, одинакова и составляет $8,1 \pm 0,2$ нМ/мин (активация репортера в 14–15 раз за 100 мин с учетом стационарной концентрации, равной 60 нМ). Это значение близко к максимальной скорости синтеза слитого белка-репортера HIF ODD-luc (7,5 нМ/мин), рассчитанной по новому уровню стационарной концентрации на основании данных рис. 2, что вполне закономерно, если учесть одинаковый промотор и один и тот же вектор, использованный при создании обеих репортерных конструкций. Значение максимальной концентрации репортера Neh2-luc при использовании насыщающей концентрации необратимых активаторов составляет 1,5 мкМ, что несколько превышает оценку максимальной концентрации для HIF ODD-luc фьюжен-белка. Однако эти незначительные расхождения обусловлены, скорее всего, хорошо известным фактом отклонения от линейности при высоких значениях люминесцентного сигнала и токсическим действием рекомбинантного белка при высокой концентрации.

Кинетическая схема действия Neh2-luc репортера для активаторов «вытеснения». Для описания действия репортера нами предложена

С х е м а



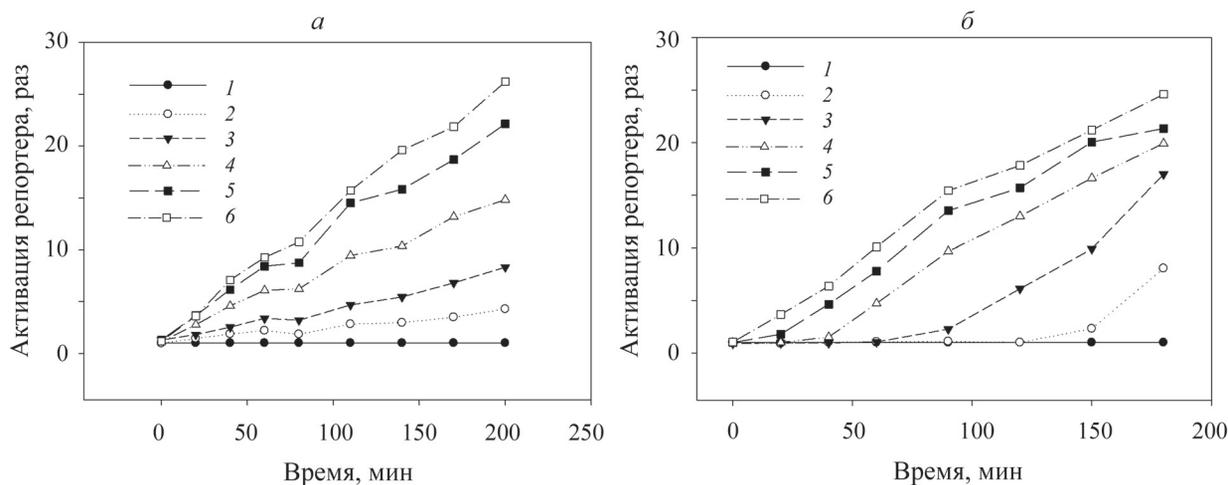


Рис. 3. Кинетика активации репортера *Neh2-luc* под действием: *a* – андрографолида (AG), *б* – бардоксолон (BD); концентрация AG (мкМ): 1 – 0; 2 – 0,25; 3 – 0,5; 4 – 1,0; 5 – 1,5; 6 – 2,0; концентрация BD (нМ): 1 – 0; 2 – 30; 3 – 60; 4 – 90; 5 – 120; 6 – 200

схема, где показано, что связывание репортера с *Keap1* – обратимый процесс (k_1 – константа скорости связывания, k_{-1} – константа скорости диссоциации), в то время как его последующее убиквитинирование (k_2) является скоростью-лимитирующей стадией в отсутствие активаторов *Nrf2*; M_0 – скорость синтеза слитого белка, равная 8,1 нМ/мин (или 0,135 нМ/с). Суммарная концентрация слитого белка с люциферазой, т.е. люминесцирующего белка (свободного и связанного с *Keap1*) равна

$$(M_0/k_2)(1 + K_s/[Keap1]).$$

По литературным данным, константа диссоциации комплекса K_s составляет около 50 нМ, что более чем на порядок ниже концентрации *Keap1* (~1 мкМ), определенной в пяти клеточных линиях мыши [16] (можно предположить, что *Keap1* в клетках человеческой нейробластомы также находится в микромолярном диапазоне). Пренебрегая значением $K_s/[Keap1]$, стационарную концентрацию всех форм фьюжен-белка можно считать равной M_0/k_2 , т.е. рассчитать k_2 из стационарного уровня люминесценции можно, поделив скорость наработки слитого белка M_0 (около 0,135 нМ/с) на стационарную концентрацию (60 нМ), таким образом, константа скорости лимитирующей стадии репортера k_2 , будет равна 0,0022 с⁻¹. Активатор «вытеснения» не разрушает комплекс убиквитинлигазы, а конкурирует с фьюжен-белком за связывание с *Keap1*, т.е. активация репортера происходит в том случае, когда *Keap1* содержится в недостаточном количестве для связывания нарабатываемого репортера. Очевидно, что при этом концентрация активатора должна находиться

как минимум на микромолярном уровне, чтобы связать почти весь эндогенный *Keap1* независимо от истинной константы диссоциации активатора. При супернасыщающей концентрации активатора происходит смена лимитирующей стадии. Концентрация свободного *Keap1* становится настолько мала, что система лимитируется стадией связывания с *Keap1* (k_1), и вкладом связанной формы репортера в суммарную люминесценцию можно пренебречь. В этом случае стационарная концентрация свободного слитого белка в присутствии активатора определенной концентрации $[I]$ будет равна

$$(M_0/k_1) \times (1 + [I]/K_i) / [Keap1]_0$$

или с учетом очень высокой концентрации активатора стационарная концентрация репортера, наблюдаемая экспериментально, будет равна

$$(M_0/k_1) \times ([I]/K_i) / [Keap1]_0.$$

Отношение стационарных сигналов люминесценции в присутствии активатора «вытеснения» с определенной концентрацией и в его отсутствие равно

$$(k_2/k_1) \times ([I]/K_i) / [Keap1]_0.$$

На рис. 4 показана кинетика активации репортера под действием активатора вытеснения NMBSA, истинная константа диссоциации которого составляет 1 мкМ [17]. При этом значительная активация репортера наблюдается при концентрациях выше 25 мкМ. Активация репортера в 10 раз с выходом на плато, наблюдаемая при концентрации активатора, равной 50 мкМ (рис. 4), предполагает смену лимитиру-

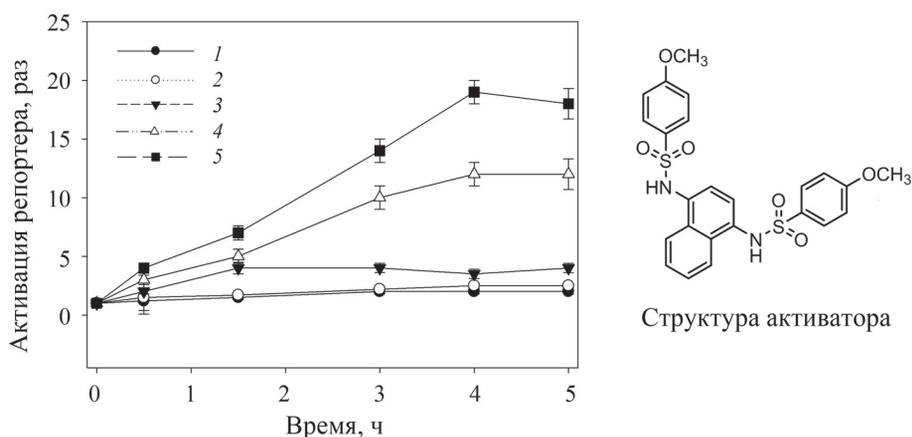


Рис. 4. Кинетика активации репортера Neh2-luc под действием активатора вытеснения NMBSA при концентрации, мкМ: 1 – 6,5; 2 – 12,5; 3 – 25; 4 – 50; 5 – 100 (справа показана структура активатора)

ющей стадии и позволяет рассчитать на основании вышеприведенной формулы значение ее константы скорости $k_1 = 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

Таким образом, принципиальным ограничением эффективности действия активаторов «вытеснения» является не столько их истинная константа диссоциации, сколько высокое значение концен-

трации эндогенного Keap1, что приводит к понижению их биологической эффективности на многие порядки.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-01480а).

Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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.
- Nguyen T., Huang H.C., Pickett C.B. // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 15466.
- Nguyen T., Sherratt P.J., Nioi P., Yang C.S., Pickett C.B. // *J. Biol. Chem.* 2005. 280. P. 32485.
- Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Ishii T., Igarashi K., Engel J.D., Yamamoto M. // *Genes Dev.* 1999. Vol. 13. P. 76.
- Cullinan S.B., Gordan J.D., Jin J., Harper J.W., Diehl J.A. // *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24. P. 8477.
- Zhang D.D., Lo S.C., Cross J.V., Templeton D.J., Hannink M. // *Mol Cell Biol.* 2004. Vol. 24. P. 10941.
- Zhang D.D. // *Drug Metab Rev.* 2006. Vol. 38. P. 769.
- Gazaryan I.G., Thomas B. // *Neural. Regen. Res.* 2016. Vol. 11. P.1708.
- Komatsu M., Kurokaw H., Waguri S., Taguchi K., Kobayashi A., Ichimura Y., Sou Y.S., Ueno I., Sakamoto A., Tong K.I., Kim M., Nishito Y, Iemura S., Natsume T., Ueno T., Kominami E., Motohashi H., Tanaka K., Yamamoto M. // *Nat. Cell Biol.* 2010. Vol. 12. P. 213.
- 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.
- Smirnova N.A., Rakhman I., Moroz N., Basso M., Payappilly J., Kazakov S., Hernandez-Guzman F., Gaisina I.N., Kozikowski A.P., Ratan R.R., Gazaryan I.G. // *Chem Biol.* 2010. Vol. 17. P. 380.
- Poloznikov A.A., Zakhariants A.A., Nikulin S.V., Smirnova N.A., Hushpalian D.M., Gaisina I.N., Tonevitsky A.G., Tishkov V.I., Gazaryan I.G. // *Biochimie.* 2017. Vol. 133. P. 74.
- Osipyants A.I., Smirnova N.A., Khristichenko A.Y., Hushpalian D.M., Nikulin S.V., Chubar T.A., Zakhariants A.A., Tishkov V.I., Gazaryan I.G., Poloznikov A.A. // *Biochemistry (Mosc).* 2017. Vol. 82. P. 1207.
- Гайсина И.Н., Христиченко А.Ю., Гайсин А.М., Смирнова Н.А., Газарян И.Г., Полозников А.А. // *Изв. РАН. Сер. хим.* 2018. В. 12. С. 2320.
- Bruick R.K., McKnight S.L. // *Science.* 2001. Vol. 294. P. 1337.
- Iso T., Suzuki T., Baird L., Yamamoto M. // *Mol. Cell Biol.* 2016. Vol. 36. P. 3100.
- Marcotte D., Zeng W., Hus J.C., McKenzie A., Hession C., Jin P., Bergeron C., Lugovskoy A., Enyedy I., Cuervo H., Wang D., Atmanene C., Roecklin D., Vecchi M., Vivat V., Kraemer J., Winkler D., Hong V., Chao J., Lukashev M., Silvilan L. // *Bioorg. Med. Chem.* 2013. Vol. 21. P. 4011.

Поступила в редакцию 10.03.2019
Получена после доработки 12.03.2019
Принята к публикации 14.03.2019

QUANTITATIVE ANALYSIS OF CELL-BASED LUCIFERASE FUSION REPORTERS

A.Yu. Khristichenko¹, A.A. Poloznikov¹, D.M. Hushpulian¹, N.A. Smirnova¹,
A.A. Zakhariants², S.V. Kazakov³, V.I. Tishkov^{2,4,5*}, I.G. Gazaryan^{1,2,4}

(¹*D. Rogachev National Medical Research Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Healthcare Ministry of Russia;* ²*Innovations and High Technologies MSU Ltd;* ³*Department of Chemistry and Physical Sciences, Dyson College, Pace University;* ⁴*M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry College;* ⁵*A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences;* **e-mail: vitishkov@gmail.com*)

Cell-based reporters expressing luciferase fusions with transcription factors or their protein stability domains can be considered as microbioreactors providing the way to directly monitor the real-time stability of the luciferase labeled transcription factor or its domain. To understand principal advantages and/or limitations of these systems for the applied and fundamental research purposes one needs to develop a quantitative description of their performance based on the determination of actual intracellular concentrations of the fusion proteins and rates of their production. In this work, the experimental data generated by means of luciferase activity calibration were used to calculate the steady-state intracellular concentrations of luciferase fusions in SH-SY5Y neuroblastoma cell lines stably expressing HIF1 ODD-luc and Neh2-luc proteins. For both reporters, the concentration of fusion proteins was determined as 60–80 nM, the values close to those for Michaelis constants for HIF prolyl hydroxylase (10–100 nM HIF) and the dissociation constant for Keap1–Nrf2 complex (50 nM), the parameters controlling rate-limiting steps of HIF1 ODD-luc and Neh2-luc reporter performance, respectively. New data allowed us to calculate the production rates and maximum concentrations for the fusion proteins under the conditions of irreversible activation and protein stabilization. The quantitative analysis of the Neh2-luc reporter performance employing the newly generated parameters explains the multi-order shift in the apparent activation constant versus the “real” dissociation constant determined for a known Nrf2 displacement activator using fluorescent polarization homogeneous assay with recombinant Keap1 and labeled Nrf2 peptide.

Key words: Nrf2, Keap1, HIF, prolyl hydroxylase, bardoxolone, andrographolide, displacement activator.

Христиченко Анна Юрьевна – лаб.-иссл. ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ (*hristik14@gmail.com*); *Полозников Андрей Александрович* – зав. лабораторией биохимии и энзимологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, канд. хим. наук; *Смирнова Наталья Алексеевна* – ст. науч. сотр. лаборатории биохимии и энзимологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, канд. биол. наук (*nasmirno@yahoo.com*); *Хушпульян Дмитрий Михайлович* – ст. науч. сотр. лаборатории биохимии и энзимологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, канд. хим. наук (*hushpulian@gmail.com*); *Казakov Сергей Викторович* – профессор физической химии кафедры химии и физических наук Дайсон Колледжа университета Пейса, Плезантвилль, Нью-Йорк, США, докт. физ.-матем. наук (*skazakov@pace.edu*); *Захарянц Арпеник Ашотовна* – мл. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук (*arpesha@inbox.ru*); *Тишков Владимир Иванович* – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», докт. хим. наук (*vitishkov@gmail.com*); *Газарян Ирина Георгиевна* – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, – вед. науч. сотр. ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ (*igazaryan@gmail.com*).