

УДК 577.112.6

# Белки человека SLURP-1 и SLURP-2, действующие на никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, замедляют пролиферацию клеток колоректальной аденокарциномы HT-29

Е. Н. Люкманова<sup>1,2\*</sup>, М. А. Шулепко<sup>1,2</sup>, М. Л. Бычков<sup>1,2</sup>, З. О. Шенкарев<sup>1,2</sup>,  
А. С. Парамонов<sup>1,2</sup>, А. О. Чугунов<sup>1,2</sup>, А. С. Арсеньев<sup>1,3</sup>, Д. А. Долгих<sup>1,2</sup>, М. П. Кирпичников<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт (Государственный университет), 141700, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

\*E-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.10.2014

**РЕФЕРАТ** Белки человека SLURP-1 и SLURP-2, принадлежащие семейству Ly-6/uPAR, секретируются различными клетками, включая эпителиальные и иммунные. Эти белки действуют как ауто/паракринные гормоны, регулирующие рост и дифференцировку кератиноцитов, а также участвуют в контроле воспалительных процессов и злокачественной трансформации клеток. Предполагаемой мишенью SLURP-1 и SLURP-2 являются никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) типа  $\alpha 7$  и  $\alpha 3\beta 2$  соответственно. Детальные молекулярные механизмы, лежащие в основе действия SLURP-1 и SLURP-2, остаются в настоящее время не охарактеризованными. SLURP-2 – один из наименее изученных белков семейства Ly-6/uPAR. В представленной работе разработаны система продукции SLURP-2 в клетках *Escherichia coli* и протокол ренатурации белка из цитоплазматических телец включения. Получены миллиграммовые количества рекомбинантного SLURP-2 и его <sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N-меченого аналога. Рекомбинантный белок охарактеризован методом ЯМР-спектроскопии, построена модель пространственной структуры SLURP-2. На клетках колоректальной аденокарциномы человека HT-29, экспрессирующих nAChR только типа  $\alpha 7$ , проведено сравнительное исследование действия рекомбинантных белков SLURP-1 и SLURP-2. Показано, что SLURP-1 и SLURP-2 оказывают антипролиферативный эффект, вызывая значительное снижение популяции клеток в течение 48 ч, при этом методами флуоресцентной микроскопии не выявлено ни апоптотической, ни некротической гибели клеток. Полуэффективные концентрации ( $EC_{50}$ ) составили ~ 0.1 и 0.2 нМ для SLURP-1 и SLURP-2 соответственно. Максимальный эффект (~ 54 и 63% живых клеток относительно контроля) наблюдали при концентрации SLURP-1 и SLURP-2, равной 1 мкМ. Полученные данные указывают на nAChR типа  $\alpha 7$  как на главный рецептор, ответственный за антипролиферативный эффект белков SLURP в эпителиальных клетках человека.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** бактериальная экспрессия, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, ренатурация, рак кишечника, Lynx.

**СОКРАЩЕНИЯ** vd-Lynx1 – водорастворимый домен Lynx1 человека; nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор.

## ВВЕДЕНИЕ

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR) – лигандозависимый ионный канал, обнаруженный как в центральной и периферической нервной системе, так и во многих других тканях человека, в том

числе эпителии [1, 2]. Несколько лет назад у вышших животных были обнаружены белки, принадлежащие семейству Ly-6/uPAR и модулирующие действие nAChR (Lynx1, Lynx2, Lypd6, SLURP-1, SLURP-2) [3–7]. Консервативное расположение

остатков Cys (рис. 1), образующих дисульфидные связи, указывает на гомологию пространственной структуры белков Lynx и SLURP с трехпетельной структурой  $\alpha$ -нейротоксинов из яда змей, высокоэффективных и специфичных ингибиторов nAChR [8].

Секретируемые белки SLURP-1 и SLURP-2 обнаружены во многих тканях человека, включая эпителий и клетки иммунной и нервной системы [5, 6, 9, 10]. Белки SLURP влияют на рост, миграцию и дифференцировку клеток эпителия, а также участвуют в контроле воспаления и опухолевого роста [6, 11, 12]. На линии кератиноцитов Het1A показано, что SLURP-1 обладает антипролиферативной активностью и способствует апоптотической гибели клеток [11], в то же время SLURP-2 ускоряет рост кератиноцитов, замедляя их дифференцировку и ослабляя ответ на проапоптотические сигналы [6]. Кроме того, белки SLURP регулируют заживление ран на коже и слизистых оболочках [13] и принимают участие в защите клеток кожи от онкогенной трансформации, вызванной нитрозаминами – производными никотина [14, 15]. Вероятно, SLURP-1 и SLURP-2 играют роль ауто/паракринных регуляторов, а их эффекты опосредованы взаимодействием с nAChR, представленными на поверхности клеточной мембраны кератиноцитов и иммунных клеток [10, 16]. Предполагаемой мишенью действия SLURP-1 и SLURP-2 являются nAChR типа  $\alpha 7$  и  $\alpha 3\beta 2$  соответственно [6, 11]. Недавно в клетках колоректальной аденокарциномы человека HT-29 обнаружили экспрессию SLURP-1 и показали, что уровень эндогенной продукции SLURP-1 в этих клетках значительно снижается при обработке никотином [17]. В то же время клетки HT-29 могут экспрессировать только рецепторы nAChR типа  $\alpha 7$  [18].

В настоящее время структурно-функциональные свойства белков человека SLURP-1 и SLURP-2, а также механизм их действия изучены недостаточно. Основные проблемы в изучении SLURP-1 и SLURP-2 связаны с невозможностью получить достаточное количество препаратов белков из природных источников, а также со сложностью продукции рекомбинантных белков с нативной последовательностью и пространственной структурой. Вследствие этого, большая часть опубликованных ранее результатов получена с использованием гибридных конструкций, кодирующих не только белок SLURP, но и дополнительные полипептиды, которые могут значительно влиять на активность препарата. Например, SLURP-2 изучали с использованием слитой с белком SUMO конструкции (общая масса белка 22 кДа, из которых только ~ 8 кДа приходится на SLURP-2) [6].

В представленной работе впервые разработана эффективная система продукции белка SLURP-2 в клетках *E. coli* в виде цитоплазматических телец включения и предложен протокол его ренатурации. Полученный рекомбинантный аналог отличается от природного белка одним дополнительным остатком (N-концевой Met). Высокий выход (~ 5 мг ренатурированного белка с 1 л бактериальной культуры) позволил получить миллиграммовые количества рекомбинантного белка и его  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -меченого варианта. Разработка подобной системы открывает новые перспективы в структурно-функциональных исследованиях SLURP-2. Так, нами показан значительный антипролиферативный эффект SLURP-1 и SLURP-2 на клетки линии HT-29. Это позволяет предположить, что главную роль в передаче сигналов к замедлению роста эпителиальных клеток под действием белков SLURP играет nAChR типа  $\alpha 7$ .

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Клонирование и бактериальная продукция SLURP-2

Ген *slurp-2*, кодирующий 75 аминокислотных остатков белка SLURP-2 человека (рис. 1A), был сконструирован из синтетических перекрывающихся олигонуклеотидов с использованием ПЦП и с учетом частоты встречаемости кодонов в *Escherichia coli* (ЗАО «Евроген», Москва). Ген *slurp-2* был клонирован в экспрессионный вектор pET-22b(+) (Novagen) по сайтам рестрикции NdeI и BamHI. Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3), трансформированные вектором pET-22b(+)/*slurp-2* культивировали при 37°C на среде ТВ (12 г бактотриптона, 24 г дрожжевого экстракта, 4 мл глицерина, 2.3 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 12.5 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  на 1 л среды, pH 7.4) в ферментере Bioflow 3000 (New Brunswick Scientific) в условиях автоматического поддержания относительного содержания кислорода в системе не менее 30% от максимально достижимого. Экспрессию гена *slurp-2* индуцировали добавлением изопропил- $\beta$ -D-1-тиогаляктопиранозида (ИПТГ) до конечной концентрации 0.05 мМ при оптической плотности клеточной культуры 1.0 о.е. После индукции клетки культивировали в течение 8 ч.

Для продукции  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -меченого аналога SLURP-2 1 л клеточной культуры, предварительно выращенной на среде ТВ в колбах до клеточной плотности 1.0 о.е., центрифугировали в течение 20 мин при 1000 g. Клеточный осадок стерильно ресуспендировали в 1 л минимальной среды M9 (6 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 г NaCl, 2 г  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 240 мг безводного  $\text{MgSO}_4$ , 11 мг  $\text{CaCl}_2$ , 3 г глюкозы, 2 мг дрожжевого экстракта, 200 мкл 5%-ного тиаминахлорида на 1 л среды, pH 7.4), содержащей в качестве источников глюкозы

и азота  $^{13}\text{C}$ -глюкозу и  $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$  (CIL) соответственно. Индукцию и дальнейшее выращивание проводили так же, как на среде ТВ.

#### Очистка и ренатурация рекомбинантного SLURP-2

Тельца включения, содержащие SLURP-2, выделяли и отмывали согласно протоколам, описанным ранее для SLURP-1 [19]. Отмытые тельца включения ресуспендировали в 30 мМ Трис-НСl-буфере, рН 8.7, содержащем 8 М мочевины, 0.4 М сульфата натрия, 0.15 М тетрагидрата натрия из расчета 10 мл буфера на 1 г тельца включения. Суспензию дезинтегрировали ультразвуком (Branson Digital Sonifier) при выходной мощности 50 Вт и  $4^\circ\text{C}$  в течение 1 мин и оставляли на 8 ч при слабом перемешивании. Затем суспензию центрифугировали при 36000 *g* и  $4^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, супернатант разводили в 10 раз 2 М мочевиной. После этого препарат сульфитированного SLURP-2 наносили на колонку с DEAP-сферонит-ОН (совместная разработка ГНИИ ОЧБ, Санкт-Петербург и ИБХ РАН), предварительно уравновешенную буфером А (30 мМ Трис-НСl, рН 8.0). После нанесения белка колонку последовательно промывали буфером А, буфером А с добавлением 1 М NaCl, буфером А с добавлением 8 М мочевины. Сульфитированный SLURP-2 элюировали буфером А с добавлением 8 М мочевины и 0.5 М NaCl. Во фракции, содержащие SLURP-2, добавляли 1000-кратный (по отношению к белку) молярный избыток ДТТ. Восстановленный SLURP-2 очищали с помощью ВЭЖХ (Jupiter C4, A300,  $10 \times 250$  мм, Phenomenex). SLURP-2 элюировали градиентом ацетонитрила (20–45%) в течение 40 мин в присутствии 0.1% ТФУ. Препарат восстановленного SLURP-2 лиофилизировали и растворяли в буфере для ренатурации, содержащем 50 мМ Трис-НСl, рН 9.0, 2 М мочевины, 0.5 М L-аргинин, 2 мМ GSH и 2 мМ GSSG, до конечной концентрации белка 0.1 мг/мл. Ренатурацию проводили при  $4^\circ\text{C}$  в течение 3 сут. Анализ и очистку SLURP-2 после ренатурации проводили с помощью ВЭЖХ (Jupiter C4, A300,  $4.6 \times 250$  мм, Phenomenex). Ренатурированный препарат SLURP-2 лиофилизировали.

#### ЯМР-спектроскопия и моделирование структуры SLURP-2

ЯМР-спектры  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -меченого и немеченого SLURP-2 (концентрация образцов 0.5 мМ) получали при температуре  $30^\circ\text{C}$  на спектрометре AVANCE-700 (Bruker).

Для моделирования структуры SLURP-2 в качестве шаблона использовали белок вд-Lynx1 (PDB 2L03). Выравнивание аминокислотных последовательностей было построено на веб-сервере Clustal

(www.clustal.org). Модель построена при помощи программы Modeller V8.2 [20].

#### Работа с клеточной линией HT-29

Клетки колоректальной аденокарциномы HT-29 (НИИ Цитологии РАН, Санкт-Петербург) поддерживали в среде RPMI1640 (ООО «ПанЭко», Москва) с добавлением 5% эмбриональной бычьей сыворотки (Nucclone, Thermo Fisher Scientific). Клетки поддерживали в гумидифицированной атмосфере ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) и пересевали каждые 48 ч.

За 16 ч до эксперимента клетки рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты из расчета  $10^4$  клеток на лунку. После адсорбции к клеткам добавляли препараты SLURP-1 и SLURP-2 (рекомбинантный препарат SLURP-1 получен согласно протоколу, описанному в [19]). Все препараты разводили в культуральной среде. Клетки инкубировали с препаратами SLURP-1 и SLURP-2 в течение 48 ч. Пролиферацию клеток изучали с помощью реагента WST-1 (water soluble tetrazolium salt 1, Santa Cruz). WST-1 растворяли в 20 мМ HEPES (рН 7.4), реактив для транспорта электронов 1-м PMS (1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate, Santa Cruz) растворяли в деионизованной воде, после чего растворы смешивали и добавляли в лунки планшета из расчета 0.5 мМ WST-1 и 20 мкМ 1-м PMS на лунку. После инкубации в течение 3 ч с WST-1 жизнеспособность клеток оценивали спектрофотометрически по поглощению при 450 нм с выравниванием фона при 655 нм (спектрофотометр BioRad 680, BioRad Laboratories).

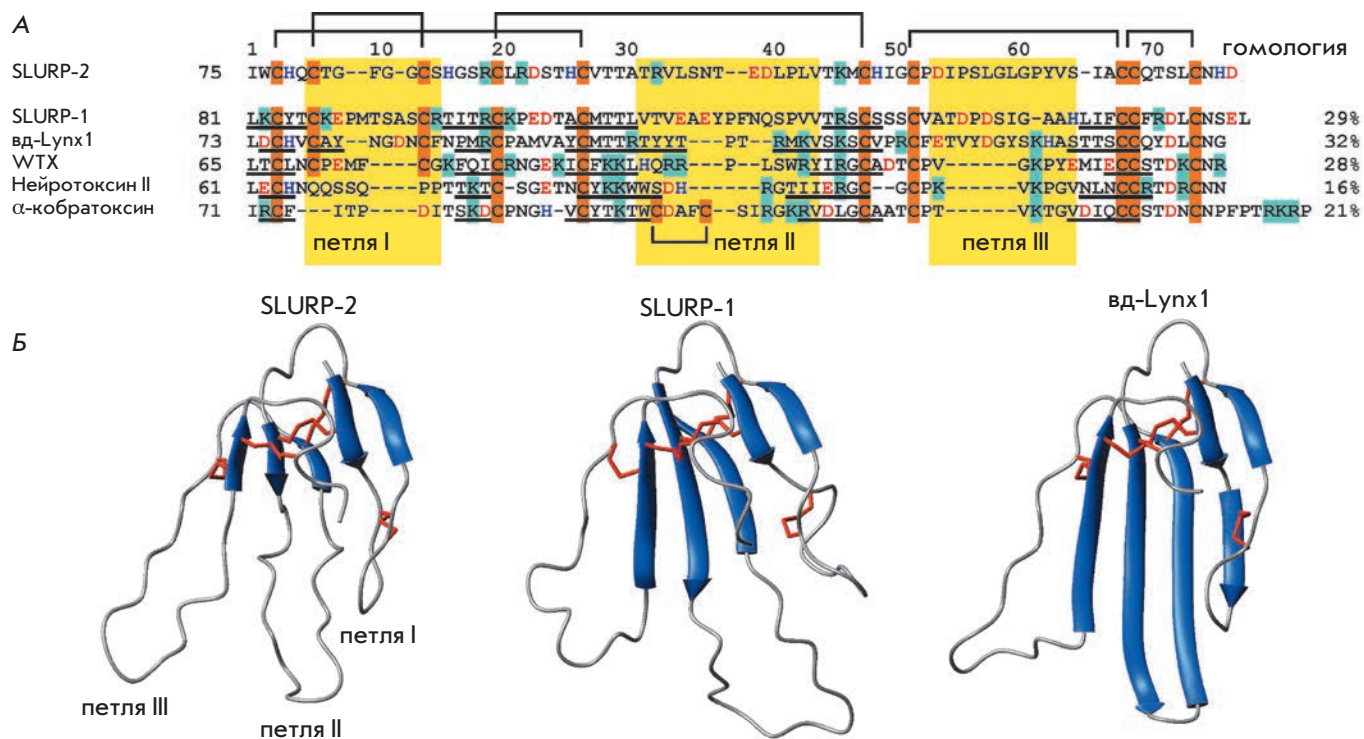
#### Флуоресцентная микроскопия

Морфологию ядер опухолевых клеток изучали с использованием красителя Hoechst 33342 (Sigma). Некротическую гибель клеток определяли, окрашивая клетки йодидом пропидия (Sigma). Клетки обрабатывали так же, как и при исследовании пролиферации, но по истечении времени инкубации с препаратами SLURP-1 и SLURP-2 к клеткам добавляли 1 мкМ красителя Hoechst 33342 и 0.5 мкМ йодида пропидия, после чего анализировали ядра с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100-f (Nikon Corp.) с использованием  $\times 40$  объектива.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

##### Бактериальная продукция и ренатурация SLURP-2

Ранее на примере «слабого» токсина WTX из яда кобры *Naja kaouthia* [21], водорастворимого домена белка человека Lynx1 (вд-Lynx1), модулирующего работу nAXP [22], и белка человека SLURP-1 [19] было



**Рис. 1.** Сравнение структур трехпетельных белков семейства Ly-6/uPAR. **А** — сравнение аминокислотных последовательностей SLURP-1, SLURP-2, вд-Lynx1 человека, нейротоксина WTX из *Naja kaouthia* и нейротоксина II из *N. oxiala* и α-кобротоксина из *N. kaouthia*. Заряженные остатки и остатки Cys выделены цветом, дисульфидные связи показаны скобками. Фрагменты белков, образующие β-тяжи, подчеркнуты. Гомология аминокислотной последовательности между SLURP-2 и другими трехпетельными белками рассчитана в программе CLUSTAL W2. **Б** — сравнение модели структуры SLURP-2 с пространственной структурой SLURP-1 (Шенкарев и др. в печати, PDB 2MUO) и вд-Lynx1 ([23] PDB 2L03)

показано, что оптимальным способом получения рекомбинантных трехпетельных белков, содержащих пятую дисульфидную связь в первой петле (рис. 1А), является продукция в виде цитоплазматических телец включения с последующей ренатурацией. Рекомбинантный белок SLURP-2 также получили с применением этого подхода. Выход белка SLURP-2 с восстановленными дисульфидными связями составил около 40 и 15 мг на 1 л бактериальной культуры на «богатой» (ТВ) и минимальной (М9) средах соответственно. Однако протоколы ренатурации, разработанные ранее для других трехпетельных белков [19, 21, 22], оказались малоэффективными для ренатурации SLURP-2.

С целью оптимизации условий ренатурации SLURP-2 были опробованы различные концентрации восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) форм глутатиона (4 : 1 mM, 4 : 2 mM, 2 : 2 mM, 3 : 0.3 mM) и значения pH (7.0–9.0) ренатурирующего буфера (рис. 2А,Б). При оптимальных условиях (см.

«Экспериментальную часть») выход ренатурированного SLURP-2 и его <sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N-меченого аналога составил 4.6 и 3 мг с 1 л бактериальной культуры соответственно. Гомогенность препарата ренатурированного SLURP-2 была подтверждена с помощью электрофореза в ПААГ (рис. 2В), ВЭЖХ (рис. 2А) и масс-спектрометрии (рис. 2Г). Молекулярная масса рекомбинантного белка составила (8146 Да), что с учетом ошибки эксперимента соответствует теоретически рассчитанной массе SLURP-2 (8145 Да) с пятью замкнутыми дисульфидными связями и дополнительным N-концевым остатком метионина. Формирование дисульфидных связей также подтверждено с помощью реактива Элмана.

### ЯМР-спектры и моделирование структуры SLURP-2

Анализ корреляционного 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-ЯМР-спектра рекомбинантного SLURP-2 (рис. 3А) подтвердил гомогенность и чистоту полученного препарата.

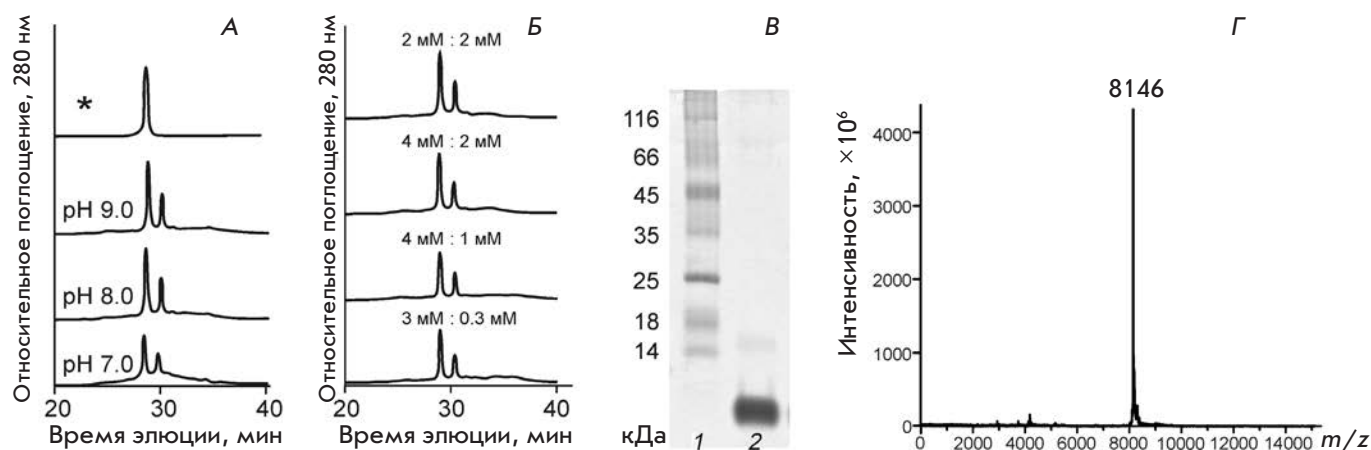


Рис. 2. Анализ рекомбинантного препарата SLURP-2. А, Б – эффективность ренатурации SLURP-2 зависит от значения pH ренатурирующего буфера (А) и концентраций восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) форм глутатиона (Б). Звездочкой обозначен пик, соответствующий очищенному препарату ренатурированного SLURP-2. В – электрофоретический анализ SLURP-2, полученного из телец включения, после ренатурации и очистки с помощью ВЭЖХ. Г – масс-спектрометрический анализ ренатурированного SLURP-2

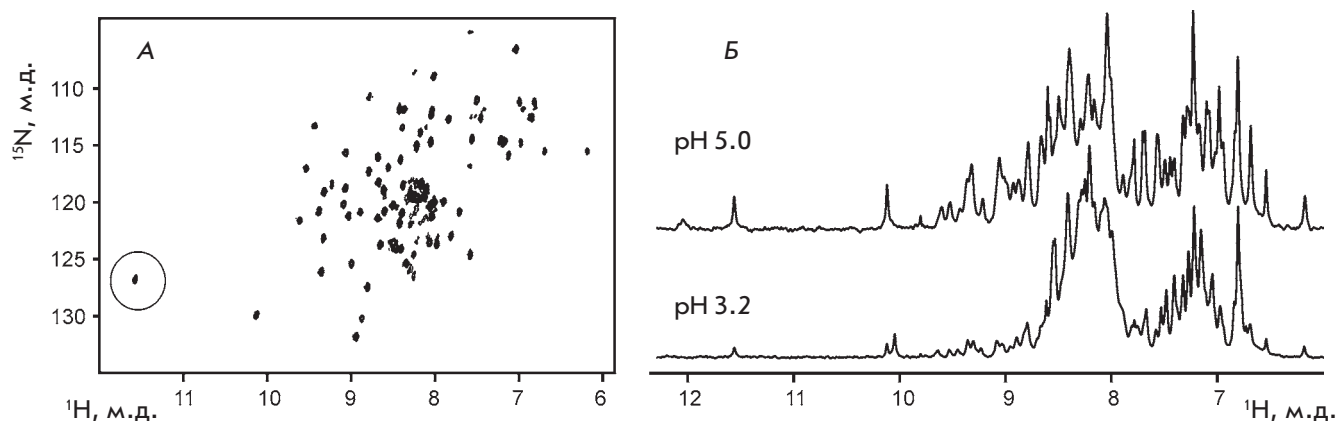
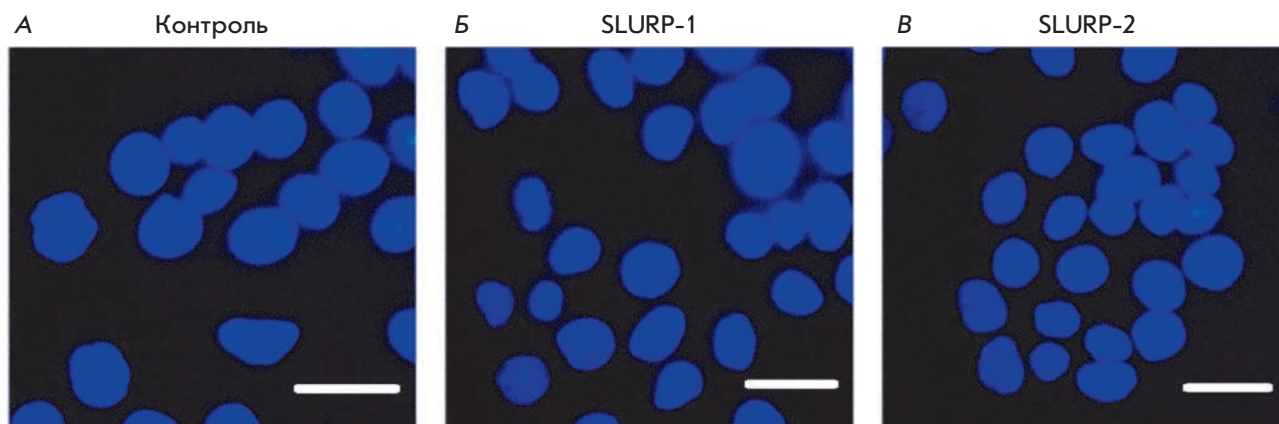


Рис. 3. Анализ рекомбинантного препарата SLURP-2 методом ЯМР-спектроскопии. А – 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-спектр 0.5 мМ  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -меченого SLURP-2 (30°C, pH 5.0). Б – фрагменты 1D  $^1\text{H}$ -спектров немеченого SLURP-2 при pH 5.0 и 3.2

Значительная дисперсия  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -сигналов основной цепи (от 7 до 9.7 м.д.) указала на наличие  $\beta$ -структурных регионов в белке. В ЯМР-спектрах наблюдался один набор сигналов, что свидетельствует об отсутствии конформационной гетерогенности, обусловленной *цис-транс*-изомеризацией пептидных связей Xxx-Pro. Этим белок SLURP-2 схож с вд-Lynx1, имеющим одну структурную форму в растворе [23], и отличается от SLURP-1, который в растворе находится в виде двух равно заселенных структурных форм, возникающих из-за «медленной» (по шкале ЯМР)

изомеризации пептидной связи Tyr39-Pro40 [19]. В этой связи следует отметить, что, согласно анализу аминокислотной последовательности, SLURP-2 имеет большую гомологию с вд-Lynx1, чем с белком SLURP-1 (32 и 29% соответственно, рис. 1А). Интересно, что белки Lynx1 и SLURP-2 человека являются продуктами альтернативного сплайсинга одного гена, находящегося на хромосоме 8.

На схожесть структуры SLURP-2 и вд-Lynx1 указывает также присутствие в спектре ЯМР характерного  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -сигнала, смещенного в слабое поле



**Рис. 4.** Влияние препаратов SLURP-1 и SLURP-2 на морфологию ядер клеток колоректальной аденокарциномы HT-29. А – клетки без добавления белков SLURP. Б, В – клетки в присутствии 1 мкМ SLURP-1 и 1 мкМ SLURP-2 соответственно после инкубации в течение 48 ч. Ядра клеток прокрашены красителями Hoechst 33342 и йодидом пропидия. Масштаб линейки 10 мкм

(11.6 м.д.) (обведен кружком, *рис. 3А*). Согласно опубликованной пространственной структуре *vd-Lynx1* [23], значительное смещение сигнала HN-группы остатка Asn15 в слабое поле вызвано образованием водородной связи с боковой цепью His4. В структуре SLURP-2 подобная водородная связь может быть образована боковой цепью His4 и HN-группой основной цепи His14. При изменении значения pH препарата SLURP-2 от 5 до 3 значительно уменьшалась интенсивность сигналов в слабopольном регионе (8.7–9.7 м.д.) <sup>1</sup>H-спектра ЯМР с одновременным увеличением интенсивности сигналов в районе 8 м.д. (*рис. 3Б*). Это свидетельствовало о частичном разрушении пространственной структуры белка, сопровождаемом переходами отдельных фрагментов из β-структурной конформации в конформацию неупорядоченного клубка. Схожую pH-индуцированную денатурацию ранее наблюдали для *vd-Lynx1*, но не SLURP-1 (Шенкарев и др., неопубликованные данные).

Учитывая эти косвенные признаки сходства пространственной структуры, на основе известной структуры белка *vd-Lynx1* была построена модель SLURP-2 (*рис. 1Б*). Эта модель демонстрирует характерную трехпетельную организацию и β-структурное ядро, образованное пятью тяжами, формирующими два антипараллельных β-листа.

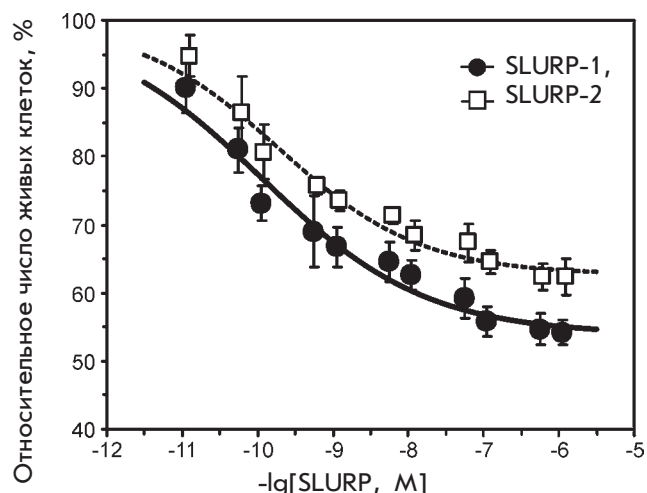
#### Исследование активности препаратов SLURP-1 и SLURP-2 на клеточной линии HT-29

Инкубация клеток колоректальной аденокарциномы HT-29 с препаратами SLURP-1 и SLURP-2 в концентрации 1 мкМ в течение 48 ч приводила к значи-

тельному уменьшению количества клеток – до  $54 \pm 2\%$  и  $63 \pm 2\%$  относительно контроля соответственно. Анализ морфологии ядер клеток с помощью флуоресцентной микроскопии показал, что ни SLURP-1, ни SLURP-2 не вызывали апоптотической или некротической гибели клеток HT-29 (*рис. 4*). Так, уменьшение плотности клеток не сопровождалось изменением морфологии большинства клеточных ядер по сравнению с контролем, а окрашивание йодидом пропидия не выявило увеличения фракции некротизированных клеток ( $3 \pm 1\%$  в контроле и в лунках, содержащих 1 мкМ SLURP-1 и SLURP-2). Таким образом, наблюдаемые эффекты SLURP-1 и SLURP-2 связаны с замедлением пролиферации клеток HT-29.

Сравнительный анализ с помощью теста WST-1 выявил, что SLURP-1 и SLURP-2 значительно ингибируют рост опухолевых клеток HT-29. Анализ кривой доза–эффект показал, что ингибирующий эффект SLURP-1 и SLURP-2 зависит от концентрации белков (*рис. 5*). Полуэффективная концентрация ( $EC_{50}$ ) для SLURP-1 составила ~ 0.1 нМ и ~ 0.2 нМ для SLURP-2. Максимальный ингибирующий эффект достигался при концентрации белков, равной примерно 1 мкМ (*рис. 5*).

Показано, что клетки HT-29 содержат мРНК, кодирующие только α4-, α5-, α7- и β1-субъединицы nAXP [18]. Так как из этого набора только α7-субъединицы способны образовывать функциональные рецепторы [1], предположили, что α7 – единственный рецептор семейства nAXP, представленный в клетках HT-29 [18]. Вероятно, именно этот рецептор участвует в регуляции высвобождения



**Рис. 5.** Влияние препаратов SLURP-1 и SLURP-2 на пролиферацию клеток колоректальной аденокарциномы HT-29 по данным WST-1-теста. Приведены данные трех независимых экспериментов. Полученные данные (число живых клеток в % от контроля) аппроксимированы уравнением Хилла ( $y = A1 + (100\% - A1)/(1 + ([\text{SLURP}]/\text{EC}_{50})^{\text{nH}})$ ). Рассчитанные параметры  $\text{EC}_{50}$ , nH и A1 составили  $0.11 \pm 0.05$  нМ,  $0.4 \pm 0.1$  и  $54 \pm 2\%$  для SLURP-1 и  $0.19 \pm 0.07$  нМ,  $0.5 \pm 0.1$  и  $63 \pm 2\%$  для SLURP-2

интерлейкина-8 клетками HT-29 под воздействием никотина [18]. Основываясь на этих данных, мы можем предположить, что мишенью белков SLURP-1 и SLURP-2 в клетках HT-29 является nAХP  $\alpha 7$ -типа.

Ранее в экспериментах по конкуренции с  $^3\text{H}$ -никотином и  $^3\text{H}$ -эпибатином на кератиноцитах линии Het1A, которые, в отличие от HT-29, экспрессируют nAХP различных типов [24], было выдвинуто предположение, что мишенью SLURP-1 является  $\alpha 7$ -nAХP, а SLURP-2 действует преимущественно на  $\alpha 3\beta 2$ -nAХP [6, 11]. При этом SLURP-1 замедляет пролиферацию кератиноцитов [11], а SLURP-2 ее усиливает [6]. Таким образом, можно предположить,

что ингибирующий эффект SLURP-1 и SLURP-2, наблюдаемый на клетках Het1A и HT-29, опосредован взаимодействием с  $\alpha 7$ -nAХP. Активирующий эффект SLURP-2 на кератиноциты был, по-видимому, обусловлен его взаимодействием с  $\alpha 3\beta 2$ -nAХP. Меньшая по сравнению со SLURP-1 антипролиферативная активность SLURP-2 на клетках HT-29 связана, возможно, с меньшим сродством этого белка к  $\alpha 7$ -nAХP.

**ВЫВОДЫ**

В представленной работе разработана эффективная система продукции малоизученного белка человека SLURP-2, получены миллиграммовые количества рекомбинантного препарата и его  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -меченого аналога. Рекомбинантный SLURP-2 отличается от природного белка наличием дополнительного N-концевого остатка Met. Эта система открывает новые возможности для проведения структурно-функциональных исследований SLURP-2, в том числе с помощью методов сайт-направленного мутагенеза. Впервые охарактеризован антипролиферативный эффект белков SLURP-1 и SLURP-2 на линии клеток колоректальной аденокарциномы человека HT-29, выдвинуто предположение, что этот эффект опосредован взаимодействием с nAХP типа  $\alpha 7$ . Полученные данные позволяют по-новому взглянуть на роль никотинового ацетилхолинового рецептора и его отдельных подтипов в регуляции роста эпителиальных клеток. ●

*Разработка системы рекомбинантной продукции SLURP-2, получение рекомбинантного препарата SLURP-2 и структурно-функциональные исследования SLURP-2 выполнены при финансовой поддержке РФФ (соглашение № 14-14-00255).  
 Продукция рекомбинантного препарата SLURP-1 и его функциональные исследования выполнены при поддержке РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология») и РФФИ (грант № 12-04-01639-а).*

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Papke R.L. // Biochem. Pharmacol. 2014. V. 89. № 1. P. 1–11.
2. Sharma G., Vijayaraghavan S. // J. Neurobiol. 2002. V. 53. № 4. P. 524–534.
3. Miwa J.M., Ibanez-Tallon I., Crabtree G.W., Sánchez R., Sali A., Role L.W., Heintz N. // Neuron. 1999. V. 23. № 1. P. 105–114.
4. Tekinay A.B., Nong Y., Miwa J.M., Lieberam I., Ibanez-Tallon I., Greengard P., Heintz N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 4477–4482.
5. Chimienti F., Hogg R.C., Plantard L., Lehmann C., Brakch N., Fischer J., Huber M., Bertrand D., Hohl D. // Hum. Mol. Genet. 2003. V. 12. P. 3017–3024.
6. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Jolkovsky D.L., Webber R.J., Grando S.A. // J. Cell Physiol. 2006. V. 208. P. 238–245.
7. Darvas M., Morsch M., Racz I., Ahmadi S., Swandulla D., Zimmer A. // Eur. Neuropsychopharmacol. 2009. V. 19. P. 670–681.
8. Tsetlin V., Utkin Y., Kasheverov I. // Biochem. Pharmacol. 2009. V. 78. P. 720–731.
9. Moriwaki Y., Watanabe Y., Shinagawa T., Kai M., Miyazawa M., Okuda T., Kawashima K., Yabashi A., Waguri S., Misawa H. // Neurosci. Res. 2009. V. 64. P. 403–412.
10. Moriwaki Y., Yoshikawa K., Fukuda H., Fujii Y.X., Misawa H., Kawashima K. // Life Sci. 2007. V. 80. P. 2365–2368.

11. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Webber R.J., Grando S.A. // *J. Invest. Dermatol.* 2005. V. 125. P. 1236–1241.
12. Chernyavsky A.I., Galitovskiy V., Shchepotin I.B., Grando S.A. // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 609086.
13. Chernyavsky A.I., Kalantari-Dehaghi M., Phillips C., Marchenko S., Grando S.A. // *Wound Repair Regen.* 2012. V. 20. № 1. P. 103–113.
14. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Grando S.A. // *Life Sci.* 2007. V. 80. P. 2243–2247.
15. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Grando S.A. // *Biochem. Pharmacol.* 2007. V. 74. № 8. P. 1315–1319.
16. Chernyavsky A.I., Marchenko S., Phillips C., Grando S.A. // *Dermatoendocrinol.* 2012. V. 4. № 3. P. 324–330.
17. Pettersson A., Nylund G., Khorram-Manesh A., Nordgren S., Delbro D.S. // *Auton Neurosci.* 2009. V. 148. P. 97–100.
18. Summers A.E., Whelan C.J., Parsons M.E. // *Life Sci.* 2003. V. 72. № 18–19 P. 2091–2094.
19. Шулепко М.А., Люкманова Е.Н., Пармонов А.С., Лобас А.А., Шенкарев З.О., Кашеверов И.Е., Цетлин В.И., Долгих Д.А., Арсеньев А.С., Кирпичников М.П. // *Биохимия.* 2013. Т. 78. № 2. С. 276–285.
20. Webb B., Sali A. // *Curr. Protocols Bioinform.* 2014. V. 47. № 5–6. P. 1–32.
21. Люкманова Е.Н., Шулепко М.А., Тихонов Р.В., Шенкарев З.О., Пармонов А.С., Вульфсон А.Н., Кашеверов И.Е., Устич Т.Л., Уткин Ю.Н., Арсеньев А.С. и др. // *Биохимия.* 2009. Т. 74. № 10. С. 1142–1149.
22. Шулепко М.А., Люкманова Е.Н., Кашеверов И.Е., Долгих Д.А., Цетлин В.И., Кирпичников М.П. // *Биоорг. химия* 2011. Т. 37. № 5. С. 609–615.
23. Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Shulepko M.A., Mineev K.S., D'Hoedt D., Kasheverov I.E., Filkin S., Janickova H., Dolezal V., Dolgikh D.A., et al. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 10618–10627.
24. Grando S.A. // *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 1997. V. 2. № 1. P. 41–48.