



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 578.245:578.54:577.213.3

АНТИВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ МУТАНТНЫХ ИНТЕРФЕРОНОВ,
НОВЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ
СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
ИНТЕРФЕРОНОВ

*Петренко В. А., Татков С. П., Сиволобова Г. Ф.,
Болдырев А. Н., Колокольцов А. А., Ерошкин А. М.,
Куличков В. А.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Интерфероны можно рассматривать как гормональные вещества с плейотропным действием, обеспечивающим общий защитный статус организма [1]. С полифункциональностью интерферонов связывают известные сложности, возникающие при использовании их для лечения раковых заболеваний или для защиты от вирусных инфекций [2]. Представляется перспективным создание искусственных узкоспециализированных аналогов интерферонов, выполняющих лишь одну заданную функцию, например антивирусную защиту организма [3, 4].

Чтобы приступить к получению таких искусственных молекул, необходимо предварительно выяснить «план», по которому построены природные молекулы интерферонов, понять, какие «мотивы» структуры отвечают за ту или иную активность. Такую информацию может дать исследование биологических свойств мутантных интерферонов. Разработанная нами стратегия изучения структурно-функциональной организации интерферона включает следующие основные этапы: 1) клонирование гена $\alpha 2$ -интерферона человека в подходящем векторе на основе ДНК фага M13, обеспечивающем его экспрессию в бактериальной клетке [5]; 2) слияние гена интерферона с геном α -пептида (N-концевого фрагмента β -галактозидазы) с целью получения легко тестируемых производных интерферона, проявляющих одновременно антивирусную и ферментативную активности [6, 7]; 3) получение мутантных генов интерферона методом локализованного мутагенеза [8, 9]; 4) определение удельной антивирусной активности мутантных интерферонов; 5) анализ первичной структуры мутантных генов интерферона; 6) соотнесение антивирусной активности интерферонов с их структурой с учетом роли отдельных аминокислотных остатков.

В настоящей работе представлены данные, полученные на завершающих этапах исследования. Определена антивирусная активность 10 аналогов лейкоцитарного $\alpha 2$ -интерферона человека (IFN), отличающихся от природного белка заменой до 15 аминокислотных остатков (рис. 1). Мутанты индуцированы действием бисульфита натрия на ген IFN [8] в составе рекомбинантной ДНК MIF-2 [6]. ДНК обеспечивает синтез в бактериях *E. coli* JM 103 [10] гибридного белка, содержащего аминокислотные остатки 1-158 IFN и аминокислотные остатки 7-146 N-концевого фрагмента β -галактозидазы *E. coli* [6].

Большинство мутантных белков, так же как и «родительский» гибрид-

	10	20	30	40	50	60	70	80
IFN	MCDLPQTHSLGSRRTLM	LLAQMRKISLFSCLKDRHDF	GFPOEEFGNQFQKAETIPV	LHEMIQOIFNLFSTKDS	AAWDETL	LDK		
MIF-228	S	F	F	F	S	L	FI	FF
MIF-237	F	F	I	F	F	I	S	
MIF-238	F	F	I	V	C	Y	L	Y
MIF-239								
MIF-229			C	FF	F	S	I	F
MIF-234	L	I	F	C	V	I	S	F
MIF-233	S	I	F	F	I	S	I	I
MIF-232	S	I	F	I	FF	I	S	F
MIF-231	S	I	F	I	FF	I	S	VV
MIF-236	L	I	F	V	F	L	F	V
IFN	FYTELYQQLN	DLEACSVIQGVGVTE	TPMLKEDSILA	VRYKVFQRTI	LYLKEKKYK	SPCAWEVVRAE	IMRFSLSLSTN	LQESLRSKE
MIF-228	I	F			C	S	V	F
MIF-237	I		S			S		F
MIF-238	I	V				L		F
MIF-239	I	V				L		F
MIF-229			L					CV
MIF-234								C
MIF-233								F
MIF-232		V						
MIF-231								V
MIF-236			I					F
								I
								F

Рис. 4. Аминокислотная последовательность α 2-интерферона человека (IFN) и его мутантов. Для мутаптных интерферонов приведены только аминокислотные замены

Характеристика мутантных интерферонов
Фенотип трансформированных бактерий – Lac⁺

Мутант	Удельная антивирусная активность *	Мутант	Удельная антивирусная активность *
MIF-2	3,5±0,1	MIF-234	Не обнаружена
MIF-228	3,0±0,3	MIF-233	
MIF-237	2,5±0,3	MIF-232	
MIF-238	2,6±0,2	MIF-231	
MIF-239	2,0±0,3		
MIF-229	2,0±0,3		

* $Ig \text{ AA/EA}$, где AA — антивирусная активность препарата (МЕ/мл), EA — β -галактозидазная активность препарата (ед. акт./мл). Препараты с MIF-236 не проявили β -галактозидазной активности.

ный белок, проявляют ферментативную активность в присутствии α -акцептора β -галактозидазы [11]. Мутации приводят к снижению антивирусной активности вариантов интерферона (таблица), причем различные аминокислотные замены обеспечивают различный вклад в этот эффект. Это позволяет дать вероятностную оценку роли отдельных аминокислот в формировании «антивирусной детерминанты» IFN (рис. 2). Наибольшую активность в ряду мутантов проявляет вариант MIF-228, мало отличающийся по антивирусному действию от исходного варианта MIF-2 (таблица). Он содержит 13 аминокислотных замен, которые можно отнести к «разрешенным». Очевидно, что соответствующие аминокислоты не обязательны для проявления активности IFN (на рис. 2 они обозначены светлыми большими столбцами). В вариантах MIF-237 и MIF-238 антивирусная активность снижена на порядок. Аминокислотные замены в этих вариантах также отнесены к «разрешенным», но, поскольку часть из них отвечает за снижение антивирусной активности белка, они обозначены на рис. 2 иначе (короткими светлыми столбцами), чем «разрешенные» замены, выявленные при анализе мутанта MIF-228. В мутантах MIF-229 и MIF-239 удельная антивирусная активность снижена на полтора порядка по сравнению с исходным вариантом. Можно предположить, что это обусловлено «запрещенными» (затрагивающими функционально важные участки) мутациями в этих белках (обозначены малыми темными столбцами на рис. 2). С большей вероятностью к «запрещенным» можно отнести мутации, выявленные при анализе вариантов MIF-234, MIF-233, MIF-232 и MIF-231, практически полностью утративших антивирусную активность (обозначены на рис. 2 большими темными столбцами).

Проведенный предварительный анализ данных не учитывает изменения вторичной и третичной структур молекул в мутантных вариантах (более подробный расчетный анализ будет представлен в последующей

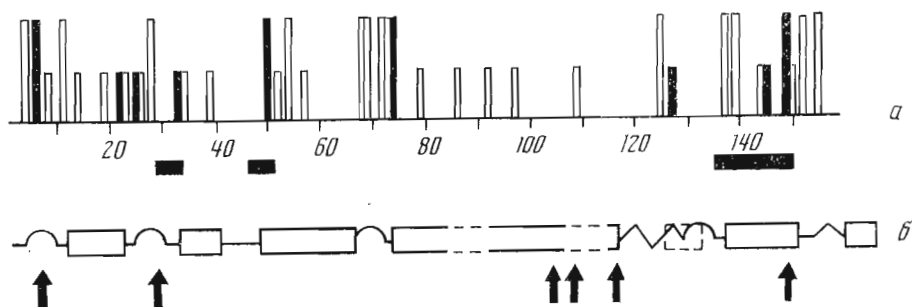


Рис. 2. Роль аминокислотных остатков IFN в формировании «антивирусной детерминанты». а — аминокислотные замены (пояснение в тексте), б — модель вторичной структуры IFN по [12]. Прямоугольники — α -спиральные участки; дуги — повороты; зигзаги — β -складчатые участки. Стрелки — места первичного протеолиза молекулы IFN [12]. Горизонтальные темные прямоугольники — консервативные участки интерферонов [13]

публикации), тем не менее позволяет сделать некоторые выводы о возможной связи структуры и антивирусной функции в молекуле интерферона. Так, полученные данные указывают на важную роль поверхностных участков молекулы (выявленных ранее [12] на основании результатов частичного протеолиза белка и обозначенных стрелками на рис. 2), особенно в местах поворота полипептидной цепи (выделены дугами на модели [12], рис. 2). «Запрещенные» замены аминокислот 34, 51, 146 и 150 входят в состав консервативных кластеров аминокислот в природных вариантах интерферона [13], что позволяет предположить участие соответствующих аминокислот в формировании «антивирусной детерминанты».

Таким образом, предложенный подход позволяет исследовать обширный ряд вариантов IFN и связать их биологические свойства со структурой белка. Изучение других неантивирусных активностей мутантов IFN позволит сделать вывод о возможной взаимообусловленности этих эффектов и связи их со структурой молекул интерферона.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Sen G. C. Pharmac. Ther.*, 1984, v. 24, № 2, p. 235–257.
2. Лечение интерфероном. Доклад Научной группы ВОЗ. Всемирная организация здравоохранения. Серия технических докладов, 676. ВОЗ, Женева, 1984, с. 14–16.
3. *Rabinstein M. Biochim. et biophys. acta*, 1982, v. 695, № 1, p. 5–16.
4. *Pestka S. Arch. Biochem. and Biophys.*, 1983, v. 221, № 1, p. 1–37.
5. *Ильичев А. А., Миненкова О. О., Зорин В. В.* В кн.: Всесоюз. совещание по программе «Плазмида». 9-е. Тез. докл. М., 1984, с. 35.
6. А. с. 1219647 (СССР). Способ получения лейкоцитарного интерферона/*Петренко В. А., Татков С. И., Семенова Л. Н., Ильичев А. А., Мизенко Г. А., Зорин В. В., Тимофеев И. В.* Опубли. в Б. И., 1986, № 11.
7. *Петренко В. А., Татков С. И., Семенова Л. Н.* В кн.: Всесоюз. совещание по программе «Плазмида». 9-е. Тез. докл. М., 1984, с. 52.
8. *Петренко В. А., Сиволобова Г. Ф., Семенова Л. Н., Болдырев А. Н., Каргинов В. А., Гуроров В. В.* Молекуляр. генетика, микробиол. и вирусол., 1985, т. 8, с. 38–44.
9. *Петренко В. А., Сиволобова Г. Ф., Болдырев А. Н., Семенова Л. Н., Каргинов В. А., Гуроров В. В.* В кн.: Всесоюз. совещание по программе «Плазмида». 9-е. Тез. докл. М., 1984, с. 194.
10. *Norlander J., Kempe T., Messing J. Gene*, 1983, v. 26, p. 101.
11. *Wetly J. K., Fowler A. V., Zabin J. J. Biol. Chem.*, 1981, v. 256, № 13, p. 6804–6810.
12. *Wetzel R., Levine H. L., Estell D. A., Shire S., Finer-Moore J., Stroud R. M., Bewley T. A.* In: *Chemistry and biology of interferons: Relationship to therapeutics*/Eds Merigan T. C., Friedman R. M., Fox C. F. N. Y.: Acad. Press, 1982, v. 25, p. 365–376.
13. *Valenzuela D., Weber H., Weissmann C. Nature*, 1985, v. 313, № 6004, p. 698–700.

Поступило в редакцию
25.VI.1986

ANTIVIRAL ACTION OF MUTANT INTERFERONS. A NEW APPROACH TO INVESTIGATION OF STRUCTURE-FUNCTIONAL ORGANIZATION OF INTERFERON

PETRENKO V. A., TATKOV S. I., SIVOLOBOVA G. F., BOLDYREV A. N.,
KOLOKOLTSOV A. A., EROSHKIN A. M., KULICHKOV V. A.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo,
Novosibirsk Region*

The developed approach to investing the structure-functional organization of interferon has been developed consisting in: 1) fusing genes of interferon and α -peptide of β -galactosidase, the resultant protein having the interferon properties and being determined by the β -galactosidase α -complementation test; 2) constructing mutant genes of interferon by the localized mutagenesis; 3) determining the mutant interferon activity; 4) deducing the amino acid sequence of mutant interferon by sequencing mutant genes; 5) analyzing structure-functional organization of interferon. In accordance with this approach, ten mutant interferons with up to 15 changes of amino acid substitutions are obtained and their antiviral activity is determined. The role of some amino acid residues in antiviral activity of interferon $\alpha 2$ is revealed.