

УДК 57.085.23;577.112.6;578.23;547.92

МОДУЛЯЦИЯ ХОЛЕСТЕРИН-ЗАВИСИМОЙ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ IC-21 CRAC-СОДЕРЖАЩИМИ ПЕПТИДАМИ С ЗАМЕНАМИ МОТИВООБРАЗУЮЩИХ АМИНОКИСЛОТ

© 2020 г. А. Я. Дунина-Барковская^{а, *}, Х. С. Вишнякова^б

^аНИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

^бИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

*e-mail: dunina@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 17.05.2020 г.

После доработки 28.05.2020 г.

Принята к публикации 29.05.2020 г.

Регуляция активности многих мембранных белков, таких как рецепторы, ионные каналы, транспортеры и ферменты, является холестерин-зависимой, однако механизмы этой регуляции остаются неясными. Ряд исследований указывает на то, что мембранные белки могут прямо взаимодействовать с холестерином благодаря наличию в их структуре так называемых CRAC-мотивов (Cholesterol-Recognizing Aminoacid Consensus). Один из возможных путей проверить и развить эту концепцию — создание CRAC-содержащих пептидов и исследование их влияния на клеточные функции. Ранее мы показали, что сконструированный нами пептид RTKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLR (далее P4), содержащий два CRAC-мотива, модулирует холестерин-зависимые взаимодействия культивируемых макрофагов IC-21 с 2-мкм частицами. В настоящей работе мы использовали ту же экспериментальную систему для выяснения роли CRAC-мотивов и отдельных мотивообразующих аминокислот; с этой целью была протестирована активность пептидов, подобных родительскому пептиду P4, но с различными модификациями CRAC-мотивов. Мы обнаружили, что пептид STKLSEMLSELGNMDKASKLSRKLSR (далее Mut2), полученный при замене серином всех мотивообразующих аминокислот в обоих CRAC-мотивах пептида P4 (W → S, V → S, R/K → S), не оказывал достоверных изменений активности клеток в диапазоне концентраций 0.5–50 мкМ, при которых наблюдались эффекты P4. Также оказался неэффективным пептид RTKLSEMLVELGNMDKAVKLSRKLR (Mut3), в обоих CRAC-мотивах которого были заменены серином только ароматические аминокислоты (W → S). Пептид STKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLSR (Mut4) с заменами только катионных аминокислот в CRAC-мотивах (R/K → S) оказывал практически такое же действие на активность клеток IC-21, что и родительский пептид P4, с хорошо выраженной колоколообразной кривой доза–эффект. При низких концентрациях (1–4 мкМ) Mut4 значительно увеличивал число частиц на клетку, при более высоких концентрациях этот параметр снижался, а при 50 мкМ Mut4 вызывал сильный токсический эффект. Наконец, пептид EWGMAVLWERNRKLDKDLKVLMLRT (Mut1), состоящий из тех же аминокислотных остатков, что и P4, но в случайном порядке (“scramble”), и содержащий один случайно образованный короткий CRAC-мотив, отличный от CRAC-мотивов родительского пептида P4, вызывал умеренную, но достоверную стимуляцию при 4–10 мкМ и не оказывал токсического действия при 50 мкМ. Как и в случае пептида P4, эффекты Mut4 и Mut1 зависели от содержания холестерина в клеточных мембранах. После инкубации клеток с метил-β-циклодекстрином, экстрагирующим холестерин из мембран, стимулирующие эффекты Mut4 и Mut1 при низких концентрациях пептидов подавлялись. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в рамках использованной экспериментальной системы CRAC-мотивы играют важную роль в механизме индуцированных пептидами модуляций холестерин-зависимых клеточных функций и что для эффекта пептида критично присутствие мотивообразующих ароматических аминокислот; замена катионных аминокислот не снижает активность пептида. Мы считаем, что CRAC-пептиды могут служить основой для развития новых инструментов для направленной регуляции активности холестерин-зависимых мембранных белков и, в частности, для разработки новых антимикробных и иммуномодулирующих средств.

Ключевые слова: холестерин, холестерин-распознающий аминокислотный консенсус (CRAC), CRAC-мотив, пептиды, белок M1 вируса гриппа, метил-β-циклодекстрин, макрофаги, адгезия

DOI: 10.31857/S0233475520050059

ВВЕДЕНИЕ

Активность многих мембранных белков — рецепторов, ионных каналов, транспортеров, ферментов и т. д. — является холестерин-зависимой [1–7]. Нарушения в распределении, транспорте и метаболизме холестерина являются существенным фактором патогенеза таких заболеваний, как атеросклероз [2, 8], СПИД [9], а также болезней Альцгеймера [10], Ниманна–Пика (Niemann–Pick) [11], Шарко–Мари–Тута (Charcotte–Marie–Tooth) [12] и многих других. Более того, холестерин-зависимые процессы играют ключевую роль в развитии многих инфекционных болезней, поскольку взаимодействия патогена с клеткой хозяина во многих случаях происходит при участии холестерина. Например, проникновение некоторых вирусов [9, 13–15] и бактерий [16–20] в клетку зависит от присутствия холестерина и липидных рафтов [15, 16, 21] в мембранах клеток хозяина. Понимание молекулярных механизмов взаимодействий белок–холестерин и их роли в клеточных процессах может создать основу для развития новых методов профилактики и лечения таких болезней.

В 1998 г. в работе Li и Papadopoulos [22] было показано, что митохондриальный холестерин-транспортирующий белок BPR (бензодиазепиновый рецептор периферического типа, позже переименованный в белок-транслокатор, TSPO [23]), содержит участок ATVLNYYVWRDNS, критически необходимый для связывания и транспорта холестерина. Авторы также обнаружили, что подобные участки, содержащие в определенном порядке катионные (R/K), ароматические (Y) и неполярные (V/L/I) аминокислотные остатки, есть и в других клеточных белках, взаимодействующих с холестерином. Авторы назвали этот участок холестерин-распознающей аминокислотной консенсусной последовательностью (cholesterol-recognizing amino-acid consensus, CRAC) и предложили общую формулу L/V-(X)₍₁₋₅₎-Y-(X)₍₁₋₅₎-R/K [22]. Подробный анализ этой идеи и ее последующей эволюции в ходе экспериментальных и теоретических исследований проведен в обзорах [24, 25].

Одним из путей проверки и развития идеи о холестерин-распознающих последовательностях в клеточных белках является дизайн CRAC-содержащих пептидов и изучение их влияния на холестерин-зависимые клеточные функции. Если эта концепция верна, то CRAC-содержащие пептиды могут оказаться полезным инструментом не только для исследований, но также для регуляции холестерин-зависимых процессов в клетках. Возможность такой регуляции *in vitro* была прямо продемонстрирована авторами CRAC-концепции в 2001 г. [26].

Ранее мы показали, что новый пептид RTKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLKR (далее P4),

сконструированный нами из двух CRAC-содержащих пептидов, соответствующих α -спиралям 3 и 6 белка M1 вируса гриппа, дозозависимо модулирует взаимодействия культивируемых макрофагов IC-21 с 2-мкм частицами [27, 28]. В настоящей работе, чтобы определить роль CRAC-мотивов и мотивообразующих аминокислот в наблюдаемых эффектах P4, мы сконструировали мутантные пептиды, по аминокислотному составу соответствующие P4, но с модифицированными CRAC-мотивами, и исследовали эффекты новых пептидов в той же экспериментальной системе. Мы обнаружили, что: (1) пептид Mut2 с заменами всех мотивообразующих аминокислот серином (V→S; W→S; R/K→S) не оказывал существенного влияния на взаимодействия макрофагов IC-21 с частицами; (2) также не влиял на активность клеток пептид Mut3, у которого были произведены замены только ароматических аминокислот в обоих CRAC-мотивах (W→S); (3) эффекты пептида Mut4 с заменами только катионных аминокислот в обоих CRAC-мотивах (R/K→S) практически не отличались от эффектов родительского пептида P4: при низких концентрациях (1–4 мкМ) Mut4 стимулировал клеточную активность, а при высоких концентрациях (~50 мкМ) оказывал токсическое действие; (4) пептид Mut1, составленный из тех же аминокислот, что и P4, но в случайном порядке (“scramble”), и имеющий один случайно образованный CRAC-мотив, отличающийся от CRAC-мотивов пептида P4, оказывал на клетки умеренное стимулирующее действие при 4–10 мкМ, но не был токсичен при 50 мкМ; (5) предварительная обработка клеток метил- β -циклодекстрином, экстрагирующим мембранный холестерин, приводила к ослаблению стимулирующих эффектов пептидов Mut4 и Mut1. Полученные данные свидетельствуют о том, что в механизме вызываемой пептидом P4 модуляции холестерин-зависимой активности клеток CRAC-мотивы играют существенную роль, и в мотиве критично присутствие ароматических аминокислот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пептиды. В работе были использованы следующие пептиды (табл. 1): Ac-RTKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLKR-NH₂ (пептид P4, 26 аминокислотных остатков, мол. масса (MM) 3764 Да; здесь и далее CRAC-мотив выделен подчеркиванием; мотивообразующие аминокислоты или их замены выделены жирным шрифтом), Ac-STKLSEMLSELGNMDKASKLSRKL-SR-NH₂ (Mut2, MM 3434 Да; 5,21W→S; 9,18V→S; 1R,25K→S), Ac-RTKLSEMLVELGNMDKAVKLSRKLKR-NH₂ (Mut3, MM 3525 Да; 5,21W→S), Ac-STKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLSR-NH₂ (Mut4, MM 3654 Да; 1R,25K→S), и Ac-EWGMAVLWERNRKLKDLKVLKMLRT-NH₂ (Mut1, MM 3764 Да).

Таблица 1. Обозначения и некоторые параметры пептидов, использованных в работе

Пептид	Аминокислотная последовательность	ММ, Да	Модификации CRAC-мотивов	Особенности пептидов
P4	Ac- RTKLW EMLV EL GNMDK AVKLWR KLKR-NH ₂	3764	—	“Родительский” пептид с двумя CRAC-мотивами [28].
Mut2	Ac- STKLSE MLSELGNMDK ASKLSR KLSR-NH ₂	3434	5, 21W→S, 9, 18V→S, 1R, 25K→S	Та же первичная структура, что у P4, но с заменами всех мотивообразующих аминокислот в обоих CRAC-мотивах.
Mut3	Ac- RTKLSE MLV EL GNMDK AVKLSR KLKR-NH ₂	3525	5, 21W→S	Та же первичная структура, что у P4, но с заменами ароматической аминокислоты (Trp) в обоих CRAC-мотивах.
Mut4	Ac- STKLW EMLV EL GNMDK AVKLWR KLSR-NH ₂	3654	R/K→S 1R, 25K→S	Та же первичная структура, что у P4, но с заменами катионных аминокислот (Arg, Lys) в обоих CRAC-мотивах.
Mut1	Ac-EWGMA V LWERNRKLKKDLKVLKMLRT-NH ₂	3764	Новый CRAC-мотив	Тот же аминокислотный состав, что у P4, но в случайном порядке (“scramble”); один CRAC-мотив, отличный от мотивов в P4.

Примечание. Все пептиды содержат 26 аминокислотных остатков. Подчеркиванием выделены CRAC-мотивы (как интактные, так и модифицированные). Интактным CRAC-мотивом считается пептид с последовательностью L/V-(X)₍₁₋₅₎-Y/W-(X)₍₁₋₅₎-R/K [22, 24]. Жирным шрифтом показаны мотивообразующие аминокислоты — как исходные, так и замещенные.

Все пептиды (чистота ≥95%) были синтезированы в Синевро (Syneuro Co. Ltd., Россия). Пептид P4 (“родительский”) был сконструирован ранее на основании комбинации двух α-спиральных CRAC-содержащих фрагментов белка M1 вируса гриппа [27, 28]. Пептид Mut1 состоял из тех же 26 аминокислот, что и P4, но в случайном порядке (“scramble”), и содержал один случайно образованный CRAC-мотив, отличный от CRAC-мотивов пептида P4. В пептидах Mut2, Mut3 и Mut4 были модифицированы только CRAC-мотивы, в остальном аминокислотная последовательность была такой же, как у пептида P4. У Mut2 в обоих CRAC-мотивах были заменены серином все мотивообразующие аминокислоты — валин, триптофан, аргинин и лизин (V→S, W→S, R/K→S); у Mut3 в обоих CRAC-мотивах серином была заменена только ароматическая аминокислота триптофан (W→S), и у Mut4 серином были заменены только катионные аминокислоты аргинин и лизин (R/K→S). Список пептидов и их основные параметры приведен в табл. 1. У всех пептидов С-конец ацетилирован. В предыдущей работе [28] мы использовали неацетилированный пептид P4; кривые дозозависимости эффектов ацетилированной и неацетилированной формы P4 существенно не различались. Перед экспериментом готовили концентрированные растворы пептидов (от 0.05 до 5 мМ) в диметилсульфоксиде

(DMSO, MP Biomedicals, Франция). При добавлении пептида в инкубационную среду с клетками конечная концентрация DMSO не превышала 1%.

Культура клеток. Опыты проводили на культивируемых клетках IC-21 — иммортализованных перитонеальных макрофагах мыши (АТСС по TIB-186™). Клетки культивировали в модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM, ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия), 2 мМ L-глутамина (ПанЭко) и 40 ед/мл гентамицина (ПанЭко) в атмосфере, содержащей 5% CO₂, при 37°C. Клетки пересевали дважды в неделю с помощью раствора Версена (ПанЭко). За два дня до экспериментов клетки рассевали на 6-луночные планшеты (Costar, США) при плотности ~50000 клеток на лунку.

Количественная оценка действия пептидов на активность макрофагов. Активность макрофагов оценивалась по их способности связывать тестовые частицы и измерялась как число ассоциированных с клеткой неопсонизированных латексных 2-мкм частиц на клетку (фагоцитозный индекс) согласно протоколу, описанному ранее [27–31], с небольшими модификациями. Клетки в 6-луночных планшетах предварительно инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ в среде DMEM без сыворотки, чтобы минимизировать ингибирующее действие сыворотки на адгезию

частиц и фагоцитоз [30]. В некоторых опытах во время этой инкубации в среду DMEM добавляли метил- β -циклодекстрин (мБЦД; Sigma, США). После предварительной инкубации в бессывороточной среде к клеткам в лунки добавляли 1 мг/мл альбумин (Sigma) и исследуемый пептид (из концентрированного раствора в DMSO) в конечной концентрации от 0.5 до 50 мкМ, а также флуоресцентные частицы (Fluoresbrite Carboxy YG 2.0 Microspheres, Polysciences, Inc., США) в количестве 8×10^6 частиц на лунку. Контролем служили клетки, к которым вместо пептида добавляли DMSO в соответствующей концентрации (0.5–1%). Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 1 ч, затем дважды промывали физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS) для удаления неприкрепившихся частиц и фиксировали 2.5% раствором (в PBS) глutarового альдегида (Ted Pella, США).

Активность клеток оценивалась по числу частиц, связанных с клеткой. Адгезия частицы на поверхности фагоцита предшествует фагоцитозу, зависит от доступности фагоцитозных рецепторов, включая интегрины, и является необходимым условием фагоцитоза [32–36]. Число частиц на клетку определяли по методике, описанной ранее [27–31]. С помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), оснащенного цифровой видеокамерой ORCA-II-ERG2 (Hamamatsu, Япония) и соответствующим программным обеспечением (Axiovision 4.5, Carl Zeiss Imaging), получали микрофотографии клеток в режиме фазового контраста и флуоресценции (возбуждение/эмиссия 490/520 и 520/590 нм для флуоресценции частиц и глutarового альдегида, соответственно). В каждой лунке фотографировали 10–20 случайно выбранных полей зрения. С помощью ImageJ и специально разработанного программного модуля [30, 31] определяли число частиц на клетку для каждого поля зрения; в каждой лунке учитывали по меньшей мере 200 клеток. Для сравнения эффектов пептидов в разных экспериментах число частиц на клетку выражали в процентах от контрольного значения, полученного в данном опыте и принятого за 100%. Поскольку активность клеток IC-21 зависит от плотности культуры [31], мы использовали неплотные культуры (~15–60 клеток на поле зрения, что соответствует примерно 5–20% от плотного монослоя). Данные представлены как среднее $\pm$ SEM; число независимых экспериментов (3–8) указано в подписях к рисункам. Достоверность различий между группами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Статистическую и графическую обработку данных проводили с помощью встроенных программ OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние пептидов на активность макрофагов.

В контрольных условиях число частиц на клетку варьировало в разных экспериментах от 1.5 до 4.2 и в среднем составляло 2.7 ± 0.2 ($\pm$ SE, $n = 27$). Рисунок 1 иллюстрирует влияние пептида P4, содержащего два CRAC-мотива (**RTKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLR**), на эффективность адгезии частиц на поверхности клеток: на рис. 1а приведен репрезентативный эксперимент, на рис. 1б — кривая доза—эффект, полученная на основании 8 независимых опытов. Концентрационная зависимость эффекта пептида P4 имеет хорошо выраженную колоколообразную форму: при 0.5–5 мкМ число частиц на клетку существенно выше контрольного значения (до ~200%); при более высоких концентрациях пептида индекс снижается и при 20–25 мкМ составляет около 50% от контроля (рис. 1б). При 50 мкМ пептид P4 оказывает токсическое действие: во всех опытах при этой дозе P4 практически все клетки погибали (рис. 1в).

Мутантный пептид Mut2 (**STKLSEMLSELGNMDKASKLSRKLSR**), в котором все мотивообразующие аминокислоты в обоих CRAC-мотивах были заменены серином (W $\rightarrow$ S, V $\rightarrow$ S, R $\rightarrow$ S), в диапазоне концентраций от 0.5 до 50 мкМ не вызывал достоверных изменений фагоцитозного индекса и не был токсичен при 50 мкМ (рис. 2а, 2б). Также оказался неэффективным пептид Mut3 (**RTKLSEMLVELGNMDKAVKLRSRKLSR**), у которого были заменены серином только ароматические аминокислоты в обоих CRAC-мотивах (W $\rightarrow$ S) (рис. 2в, 2г).

Эффекты пептида Mut4 (**STKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLSR**), в CRAC-мотивах которого только катионные аминокислоты (аргинин и лизин) были заменены серином (R/K $\rightarrow$ S), иллюстрирует рис. 3. Как и в случае P4, при низких концентрациях Mut4 значительно увеличивал активность клеток (до ~210% от контроля при 1–4 мкМ); при ~10 мкМ Mut4 фагоцитозный индекс возвращался к контролю, и при 50 мкМ развивался токсический эффект (рис. 3в); в некоторых опытах признаки токсического действия обнаруживались и при 20 мкМ Mut4. В целом, как показывает рис. 3б, концентрационные зависимости эффектов Mut4 и P4 различаются незначительно.

Мутантный пептид Mut1 (**EWGMAVLWERNRKLKDLKVLKMLRT**) был создан из тех же аминокислот, что и родительский пептид P4, но в случайном порядке (“scramble”). Пептид Mut1 содержал один случайно образованный CRAC-мотив (**VLWER**), который отличался от обоих CRAC-мотивов пептида P4 (**RTKLWEMLV** и **VKLWRKLR**). При концентрациях 2–10 мкМ пептид Mut1 умеренно (до ~160% от контроля), но достоверно увеличивал число частиц на клетку;

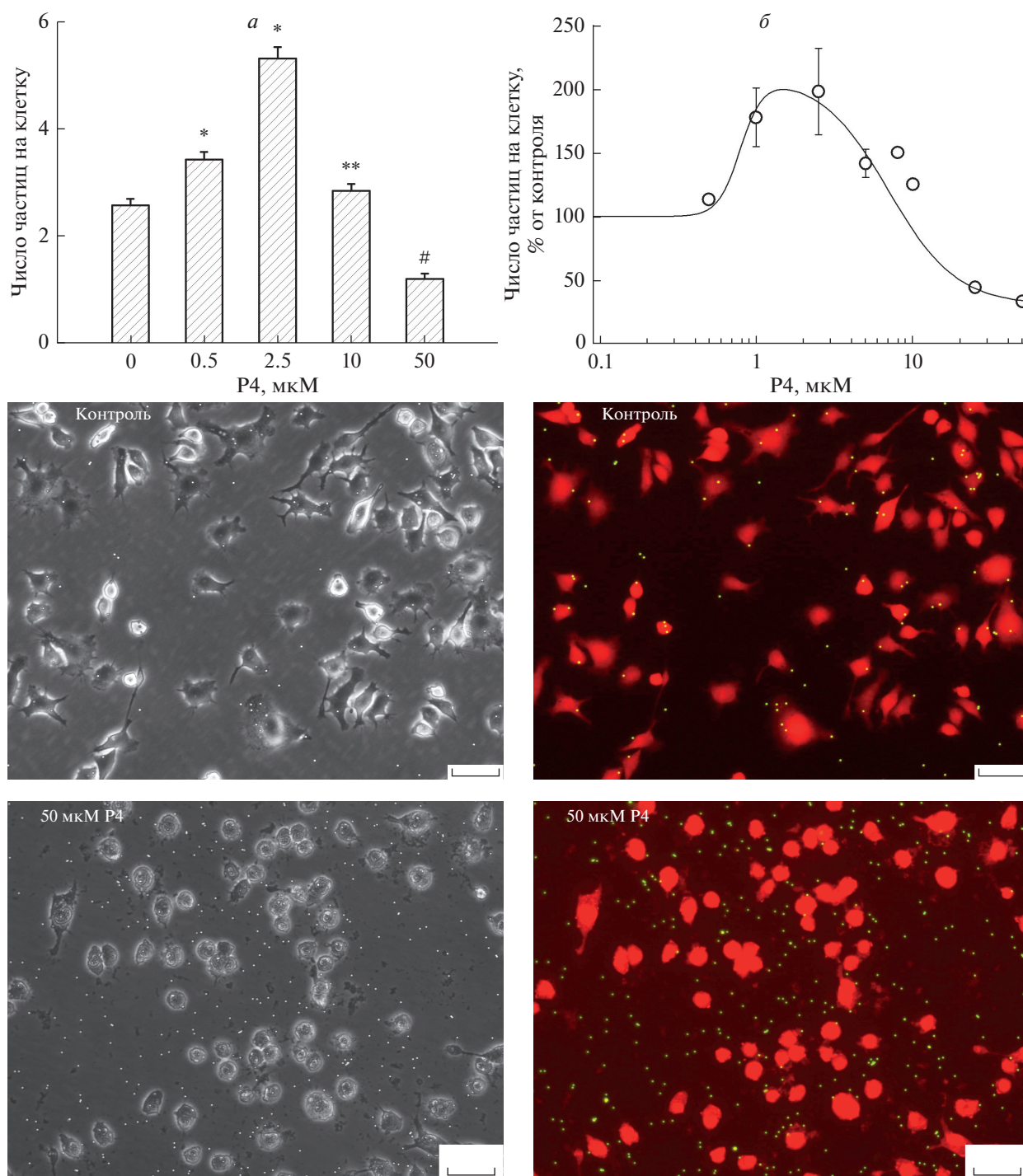


Рис. 1. Влияние пептида P4 (RTKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLR) на активность связывания 2-мкм неопсонизированных частиц культивируемыми макрофагами IC-21. *а, б* – Дозозависимость влияния пептида P4 на среднее число связанных клетками частиц. *а* – Репрезентативный эксперимент; каждая точка – среднее число частиц на клетку $\pm$ SE, полученное для ≥ 200 клеток в лунке при данной концентрации пептида. *б* – Кривая доза–эффект для P4, построенная на основании 8 независимых опытов; активность клеток выражена в процентах от контрольного значения в каждом опыте (контрольные условия: вместо пептида добавлен DMSO в соответствующей концентрации, 0.5 или 1% DMSO). Отличие от контроля достоверно по *t*-критерию Стьюдента при $p < 0.001$ (*), $p < 0.05$ (**) или $p < 0.01$ (#). *в* – Микрофотографии клеток, иллюстрирующие токсический эффект 50 мкМ P4; *слева* – фазовый контраст, *справа* – режим флуоресценции (зеленый канал – частицы, красный – глутаровый альдегид). Масштабная полоска – 50 мкм

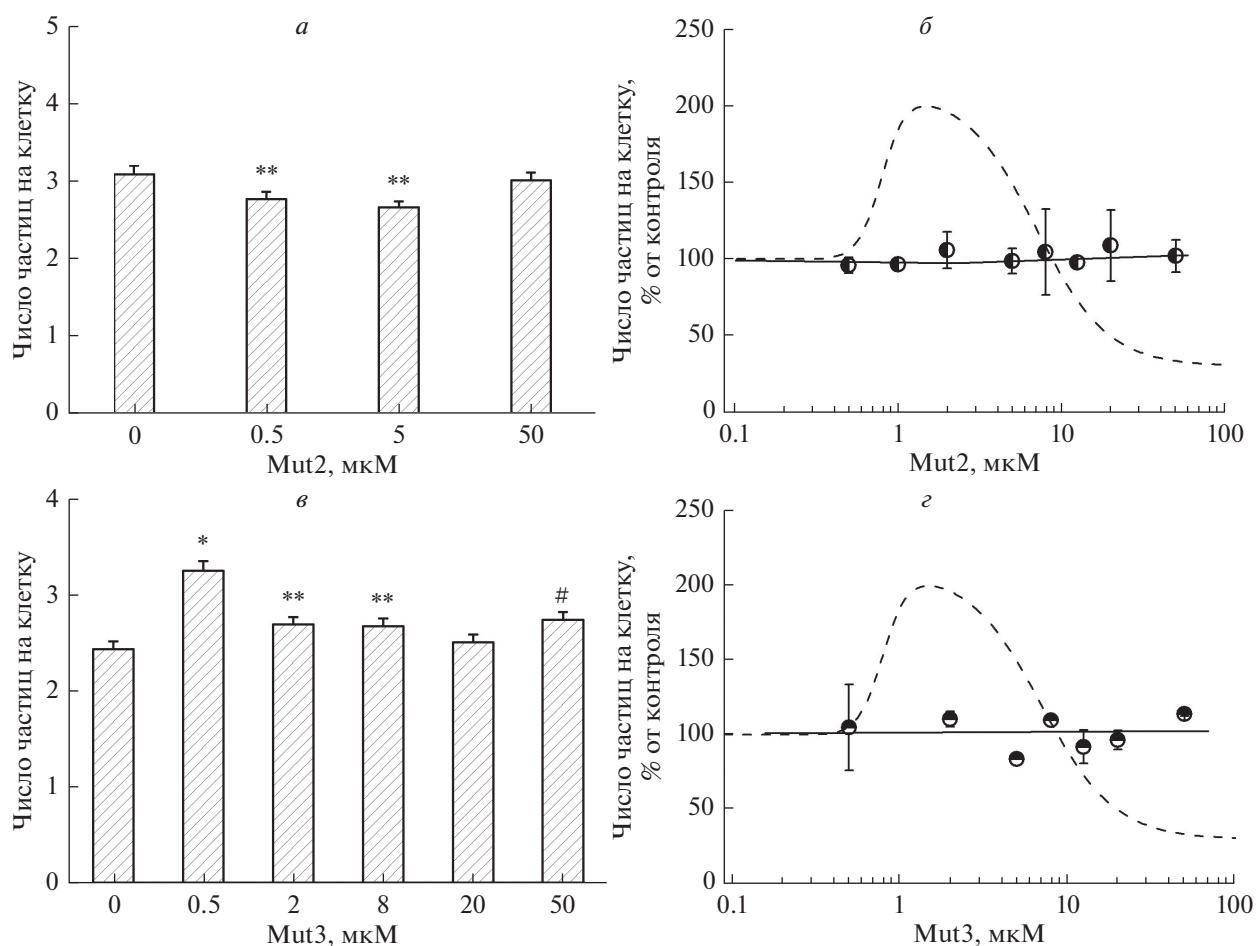


Рис. 2. Мутантный пептид Mut2 (STKLSEMLSELGNMDKASKLSRKLSR) с заменами всех мотивообразующих аминокислот (W $\rightarrow$ S, V $\rightarrow$ S, R/K $\rightarrow$ S) в CRAC-мотивах (а, б) и мутантный пептид Mut3 (RTKLSEMLVELGNMDKAVKLSRKLSR) с заменами только ароматических аминокислот (W $\rightarrow$ S) (в, г) в диапазоне концентраций 0.5–50 мкМ не вызывают достоверных изменений активности клеток IC-2. а, в – Репрезентативные эксперименты; одна колонка показывает среднее число частиц на клетку $\pm$ SE, полученное для ≥ 200 клеток в данной лунке; отличие от контроля достоверно по *t*-критерию Стьюдента при $p < 0.001$ (*), $p < 0.05$ (**) или $p < 0.01$ (#). б, г – Кривые доза–эффект для Mut2 (б) и Mut3 (г), построенные на основании 6 независимых экспериментов для каждого пептида; активность клеток выражена в процентах от контрольного значения в каждом опыте (контрольные условия: вместо пептида – DMSO в соответствующей концентрации, 0.5 или 1% DMSO). Для сравнения на графиках (б, г) приведены кривые дозозависимости для пептида P4 (штриховые линии).

максимальный эффект развивался при ~ 4 –5 мкМ (рис. 4б). При более высоких концентрациях этот показатель снижался и при 50 мкМ возвращался к контрольному уровню. В отличие от P4, мутантный пептид Mut1 при 50 мкМ не оказывал токсического действия на клетки (рис. 4в). Таблица 2 обобщает полученные данные об активности исследованных пептидов.

Модулирующее действие метил- β -циклодекстрина на эффекты пептидов P4, Mut4 и Mut1. Ранее мы показали [28], что метил- β -циклодекстрин, экстрагирующий мембранный холестерин [37–40], дозозависимо подавляет стимулирующий эффект, вызываемый пептидом P4 при низких концентрациях, и существенно снижает концентрацию токсического эффекта пептида P4

[28]. В этой работе мы обнаружили, что предварительная инкубация клеток в присутствии метил- β -циклодекстрина сходным образом модулирует эффекты пептидов Mut4 и Mut1 (рис. 5). Важно отметить, что в данной работе мы использовали низкие концентрации мБЦД (< 5 мМ), при которых мБЦД сам по себе не только не угнетал активность клеток, но и заметно увеличивал ее. Это явление описано в литературе и может объясняться существованием оптимальной концентрации холестерина и активацией холестерин-зависимых функций клеток при удалении из мембраны “избыточного” холестерина [19, 41]. В нашей системе стимулирующий эффект при низкой концентрации мБЦД можно объяснить перераспределением холестерина, экстрагированного циклодекстрином [37–

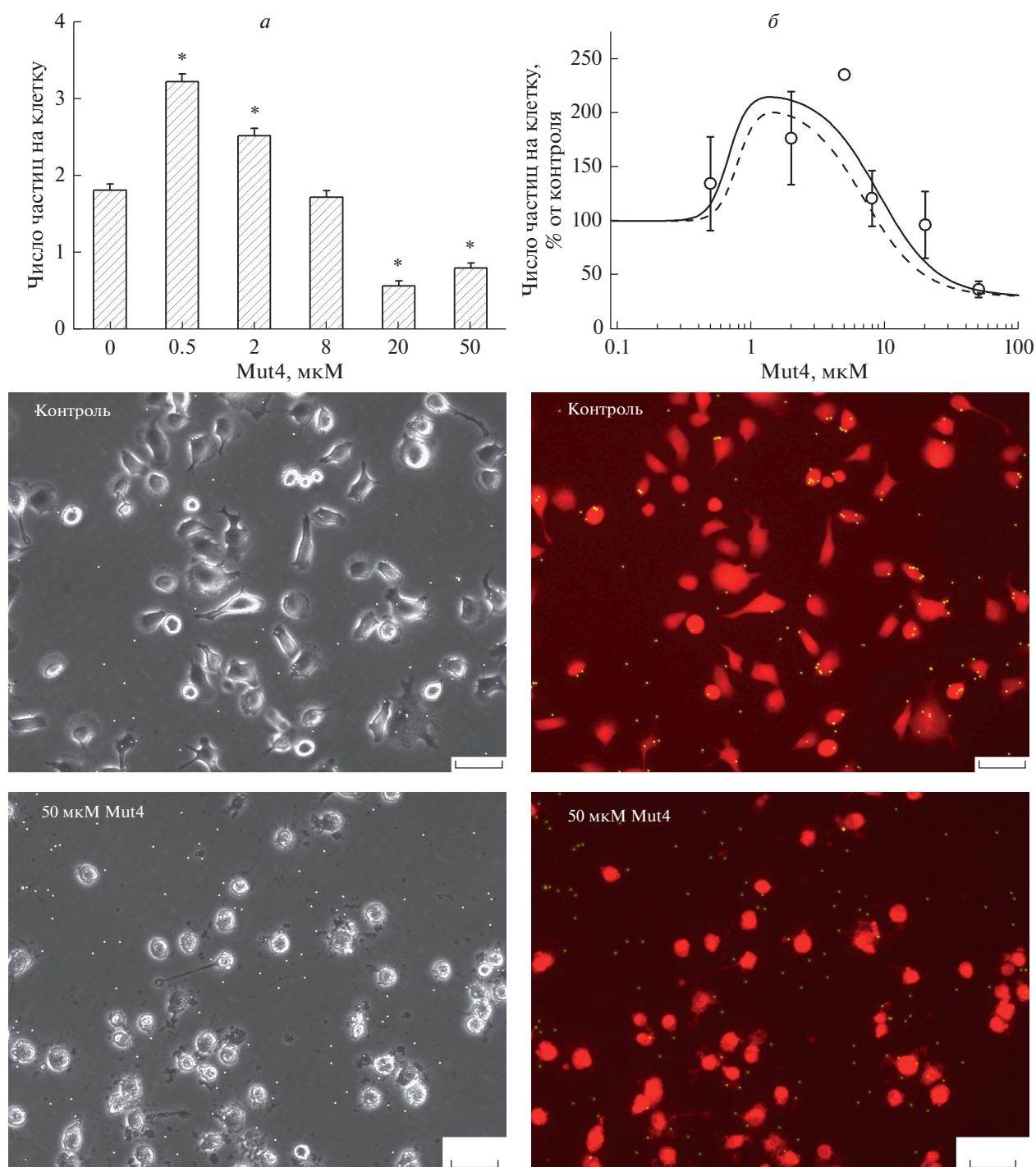


Рис. 3. Влияние на активность макрофагов IC-21 мутантного пептида Mut4 (STKLWEMLVELGNMDKAV KLWRKLSR) с заменами только катионных аминокислот в обоих CRAC-мотивах (R/K $\rightarrow$ S) сходно с эффектом пептида P4. *а, б* – Концентрационная зависимость влияния пептида Mut4 на среднее число связанных с клетками частиц. *а* – Репрезентативный эксперимент; каждая точка – среднее число частиц на клетку $\pm$ SE, полученное для ≥ 200 клеток в лунке при данной концентрации пептида; отличие от контроля достоверно по *t*-критерию Стьюдента при $p < 0.001$ (*). *б* – Кривая доза–эффект для Mut4, построенная на основании 6 независимых опытов; активность клеток выражена в процентах от контрольного значения в каждом опыте (контрольные условия: вместо пептида – 1% DMSO); для сравнения приведена кривая дозозависимости для пептида P4 (штриховая линия). *в* – Микрофотографии клеток, иллюстрирующие токсический эффект пептида Mut4; *слева* – фазовый контраст, *справа* – режим флуоресценции (зеленый канал – частицы, красный – глутаровый альдегид). Масштабная полоска – 50 μm

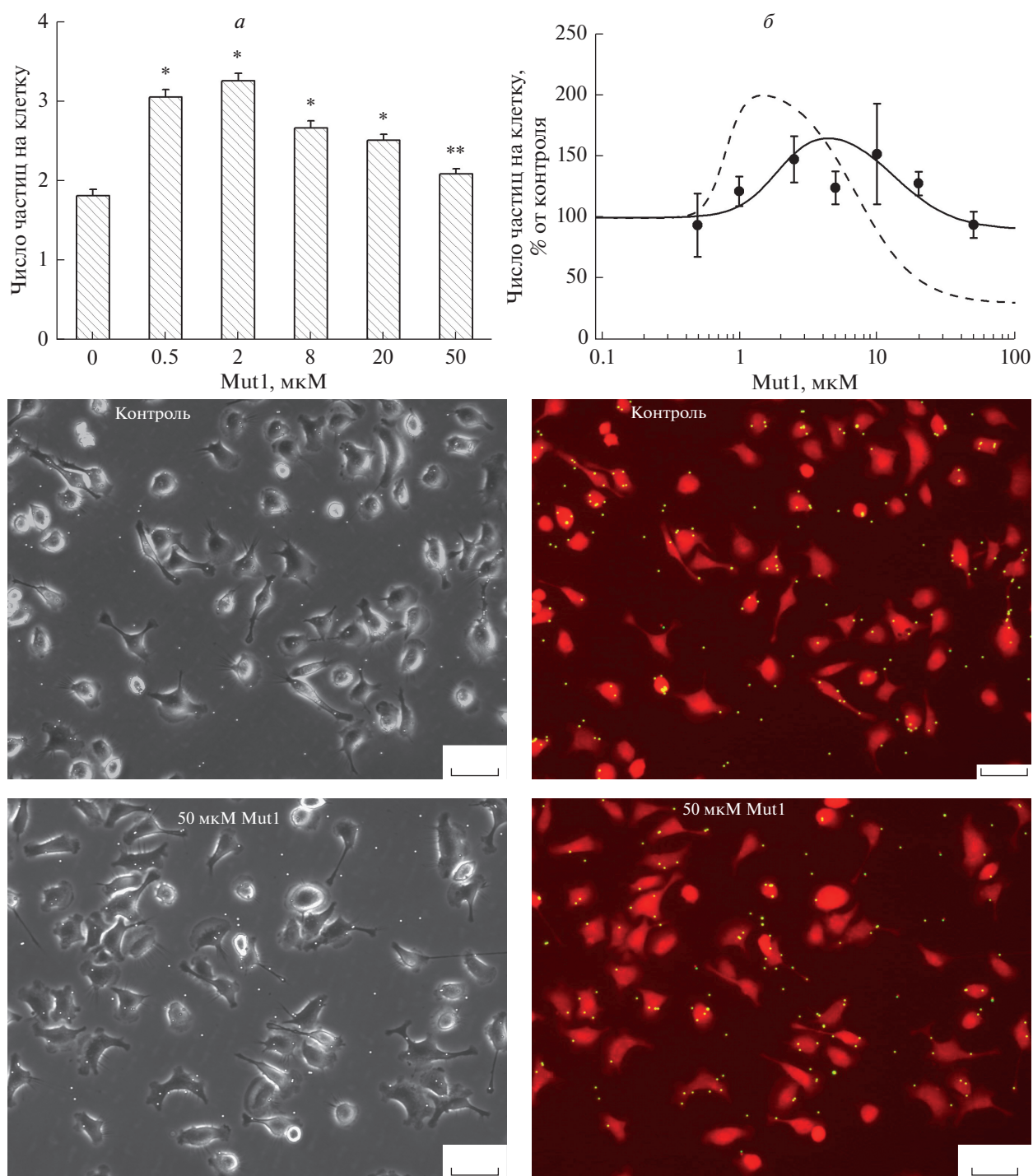


Рис. 4. Влияние на активность макрофагов IC-21 мутантного пептида Mut1 (EWGMAVLWERNRKLLKDLKVLKMLRT). *а* – Репрезентативный эксперимент; каждая точка – среднее число частиц на клетку $\pm$ SE, полученное для ≥ 200 клеток в лунке при данной концентрации пептида; отличие от контроля достоверно по *t*-критерию Стьюдента при $p < 0.001$ (*) или $p < 0.05$ (**). *б* – Кривая доза–эффект для Mut1, построенная на основании 7 независимых опытов; активность клеток выражена в процентах от контрольного значения в каждом опыте (контрольные условия: вместо пептида – 1% DMSO); для сравнения приведена кривая дозозависимости для пептида Р4 (штриховая линия). *в* – Микрофотографии клеток, иллюстрирующие отсутствие токсического эффекта при 50 мкМ Mut1: верхний ряд – контроль, нижний ряд – присутствию 50 мкМ Mut1; слева – фазовый контраст, справа – режим флуоресценции (зеленый канал – частицы, красный – флуоресцентный альдегид). Масштабная полоска – 50 мкм

Таблица 2. Эффекты исследованных пептидов в диапазоне концентраций 0.5–50 мкМ

Пептид	Стимулирующий эффект	Токсический эффект
P4 (родительский)	~200% (1–2 мкМ)*	~50 мкМ
Mut1 (“scramble” с одним CRAC-мотивом)	~160% (4–10 мкМ)*	—
Mut2 (замены всех мотивообразующих аминокислот в CRAC-мотивах)	—	—
Mut3 (замены только ароматических аминокислот в CRAC-мотивах)	—	—
Mut4 (замены только катионных аминокислот в CRAC-мотивах)	~210% (1–4 мкМ)*	20–50 мкМ

*Максимальный эффект в % от контрольного уровня, в скобках — концентрация пептида в области максимального эффекта

39], из клеток с высоким содержанием холестерина в клетки с его низким содержанием. Такое перераспределение должно приводить к снижению доли плохо работающих клеток с “избыточным” холестерином и повышению доли клеток, имеющих достаточно холестерина для нормальной работы холестерин-зависимых рецепторов, необходимых для связывания частиц клетками.

В опыте, представленном на рис. 5а, 2.5 мкМ пептид P4 дает характерную мощную стимуляцию (второй столбик); 2 мМ мБЦД немного (на ~20%), но достоверно ($p < 0.05$) увеличивает число частиц на клетку по сравнению с контролем (третий столбик); но ответ обработанных 2 мМ мБЦД клеток на 2.5 мкМ пептид P4 (четвертый столбик) значительно ослаблен (на ~60%, $p < 0.001$) по сравнению с ответом не обработанных циклодекстрином клеток на P4. Сходная картина наблюдается в случае пептидов Mut4 (рис. 5б) и Mut1 (рис. 5в). При концентрации 2 мкМ Mut4 вызывает значительное увеличение числа частиц на клетку (до ~200% от контроля, $p < 0.001$; рис. 5б). Но если пептид добавляли после обработки клеток 2 мМ мБЦД, то стимулирующий эффект 2 мкМ пептида Mut4 был на 40% слабее ($p < 0.005$), чем у клеток, не обработанных мБЦД. В случае Mut1 (рис. 5в) мБЦД также подавлял стимулирующий эффект пептида. В опыте, представленном на рис. 5в, в отсутствие мБЦД пептид Mut1 при концентрации 2 мкМ стимулировал активность клеток до 134% от контроля. У клеток, инкубированных в присутствии 3.7 мМ мБЦД без пептида, активность составляла 121% от контроля ($p < 0.001$). При добавлении 2 мкМ Mut1 после инкубации клеток с 3.7 мМ мБЦД активность клеток была достоверно ниже, чем у клеток при той же концентрации пептида в отсутствие мБЦД (на 30%, $p < 0.001$). В целом, эти результаты показывают, что инкубация клеток в присутствии экстрагирующего холестерин агента мБЦД в концентрации, при которой активность клеток увеличивается, приводит к подавлению стимулирующих эффектов пептидов P4, Mut4 и Mut1. Подавление актив-

ности клеток при сочетании пептида и мБЦД в стимулирующих концентрациях, указывает на то, что механизмы эффектов пептидов и мБЦД взаимосвязаны; в противном случае стимулирующие эффекты должны были бы складываться. Мы предполагаем, что вызванная мБЦД модуляция эффектов пептидов связана именно с изменением концентрации холестерина в клеточных мембранах.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе исследовалась роль CRAC-мотивов и мотивообразующих аминокислот в эффектах пептида P4 (Ac-RTKLWEMLVELGNMD-KAVKLWRKLR-NH₂), содержащего два холестерин-распознающих мотива. Ранее мы показали [28], что этот пептид дозозависимо влияет на активность культивируемых макрофагов IC-21, оцениваемую по их способности связывать 2-мкм частицы: при низких концентрациях (порядка 1 мкМ) P4 оказывал стимулирующее действие на клетки и был токсичен при высоких концентрациях (50 мкМ) (рис. 1, [28]). Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что модификации CRAC-мотивов в пептиде P4 существенно влияют на способность пептида модулировать активность клеток IC-21. Так, замена в пептиде P4 всех мотивообразующих аминокислот (V→S; W→S; R/K→S) приводит к полной потере активности пептида: мутантный пептид Mut2 (табл. 1), отличающийся от P4 только этими аминокислотами, не оказывал существенного влияния на число связанных частиц на клетку (рис. 2а, 2б, табл. 2). Более того, не влиял на активность клеток и мутантный пептид Mut3 (табл. 1) с заменами только триптофанов в CRAC-мотивах (W→S) (рис. 2в, 2г, табл. 2). Интересно, что замена в CRAC-мотивах только катионных аминокислот (R/K→S) практически не влияла на активность пептида: эффекты мутантного пептида Mut4 (табл. 1), отличающегося от P4 только этими аминокислотами, были очень похожи на эффекты «родительского» пептида P4 (рис. 3, табл. 2). Нако-

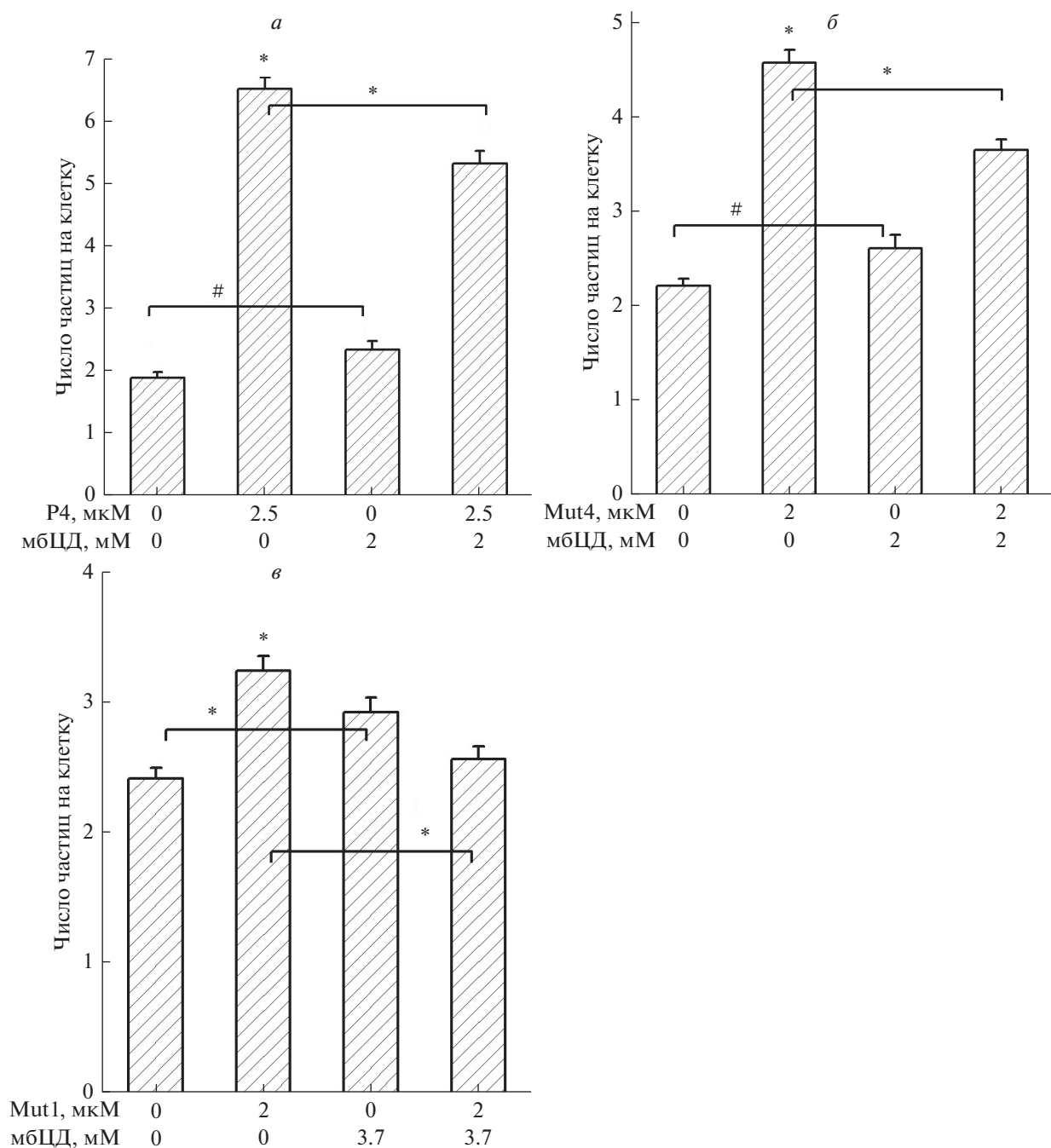


Рис. 5. Предварительная инкубация клеток в присутствии мБЦД подавляет стимулирующее действие пептидов Р4 (а), Mut4 (б) и Mut1 (в). В отсутствие пептидов мБЦД в использованных концентрациях (2 или 3.7 мМ) увеличивает активность клеток. Приведены репрезентативные эксперименты; каждая точка — среднее число частиц на клетку $\pm$ SE, полученное для ≥ 200 клеток в лунке при данной концентрации пептида; отличие от контроля достоверно по *t*-критерию Стьюдента при $p < 0.001$ (*); различия между группами, показанными квадратной скобкой, достоверны при $p < 0.001$ (*) или $p < 0.01$ (#).

нец, мутантный пептид Mut1 (табл. 1), состоящий из тех же аминокислот, что и пептид Р4, но в случайном порядке (“scramble”), и имеющий один случайно образованный CRAC-мотив, отличающийся от CRAC-мотивов родительского пептида Р4, вызывал умеренную стимуляцию клеток при

немного более высоких концентрациях, чем Р4, и не обладал токсическим действием при 50 мкМ (рис. 4, табл. 2).

Предварительная инкубация клеток в присутствии метил- β -циклодекстрина, экстрагирующего мембранный холестерин [37–39], приводила к

подавлению стимулирующих эффектов пептидов Mut4 и Mut1 при низких концентрациях (рис. 5б, 5в), подобно тому как это происходит в случае пептида P4 (рис. 5а; [28]). Как отмечалось выше, вызванное мБЦД угнетение стимулирующего эффекта пептида нельзя объяснить токсическим действием мБЦД, так как в нашей системе мБЦД при концентрациях <5 мМ не только не подавлял, но стимулировал активность клеток (рис. 5). Мы предполагаем, что холестерин-зависимое повышение клеточной активности, вызванное CRAC-содержащими пептидами P4, Mut4, и Mut1 в низкой концентрации, можно объяснить стимуляцией формирования обогащенными холестерином доменов в плазматической мембране, что способствует агрегации рецепторов, ответственных за связывание частиц [32–36]. Ослабление стимуляции и угнетение активности клеток при дальнейшем увеличении концентрации пептида может быть обусловлено конкуренцией CRAC-пептида с холестерин-зависимыми рецепторами за холестерин и нарушением нормального функционирования этих рецепторов [26]. При высоких концентрациях (~50 мкМ) пептиды, содержащие два CRAC-мотива (P4 и Mut4), становятся токсичными (рис. 1в, 3в). В работе [28] мы предположили, что холестерин-зависимый токсический эффект P4 можно объяснить и формированием трансмембранных неселективных пор (например, вследствие олигомеризации молекул пептида), что должно приводить к утечкам внутриклеточного содержимого и гибели клеток; этот же механизм может работать и в случае пептида Mut4. Возможно, пептид Mut1 с одним CRAC-мотивом не способен образовывать трансмембранные поры; также не были токсичны при концентрациях порядка десятков мкМ короткие CRAC-пептиды VLNYVW [29–31] и ATVLNYVWRDNS [26]. Механизмы цитотоксичности CRAC-содержащих пептидов требуют специальных исследований.

Наши результаты согласуются с данными ряда других работ, в которых была осуществлена экспериментальная модуляция холестерин-зависимых клеточных процессов с помощью CRAC-содержащих пептидов и продемонстрирована ключевая роль CRAC-мотивов в этих эффектах [26, 42–46]. Так, в работе Li и др. [26] было показано, что внутриклеточная доставка синтетического CRAC-пептида ATVLNYVWRDNS приводит к нарушению транспорта холестерина в митохондрии и к дозозависимому угнетению синтеза стероидных гормонов в клетках Лейдига, а при замене мотивообразующих аминокислот пептид теряет активность. В ряде работ подчеркивается ключевая роль ароматической аминокислоты в CRAC-мотиве; это может быть как тирозин, так и триптофан или фенилаланин (см. обзоры [24, 25]). Наши данные подтверждают, что присутствие триптофана в CRAC-мотивах исследованного

пептида P4 критично для активности пептида. Роль триптофана как ключевой мотивообразующей ароматической аминокислоты CRAC-пептидов показана в ряде работ [45–47]. Значение катионных аминокислот в холестерин-зависимом эффекте CRAC-содержащего пептида P4 в нашей экспериментальной системе не столь очевидно и требует уточнения. Мутантный пептид Mut4 с заменами катионных аминокислот в CRAC-мотивах был практически так же активен в отношении клеток IC-21, как и P4 (рис. 3, табл. 2). Ранее было показано, что пептид VLNYVW, представляющий собой фрагмент CRAC-мотива без катионной аминокислоты, холестерин-зависимо модулирует активность культивируемых макрофагов IC-21 [29–31]. Согласно Azarashvili и др. [48], этот же пептид предотвращает открывание неселективной митохондриальной поры (mPTP) и освобождение цитохрома c, а также других апоптотических факторов у выделенных из мозга крысы митохондрий.

Использованный в нашей работе пептид P4 был сконструирован на основе CRAC-содержащих альфа-спиралей белка M1 вируса гриппа [27], и тот факт, что пептид P4 модулирует активность макрофагов, указывает на то, что подобные модуляции могут иметь место и в целом организме, инфицированном вирусом гриппа. Это может означать, что CRAC-содержащие пептиды вирусного происхождения могут составить основу для разработки новых препаратов, регулирующих различные жизненно важные холестерин-зависимые процессы, среди которых значительное место занимают взаимодействия клеток с микробами [9, 13–20]. Возможность влиять на процесс инфицирования клеток *in vitro* с помощью CRAC-содержащего пептида вирусного происхождения была продемонстрирована в работе Cheng и др. [45]. Авторы сообщили, что пептид C5A, содержащий аминокислотные остатки 3–20 из амфипатического α -спирального N-концевого домена белка NS5A вируса гепатита C, подавлял размножение вируса более чем на 5 порядков. Интересно, что авторы не пользуются понятием CRAC-мотива, но присутствие этого мотива в пептиде C5A очевидно: SWLRDIWDWICEVLSDFK [45]. В 2018 г. была продемонстрирована антивирусная активность того же пептида C5A в отношении вируса иммунодефицита человека HIV [46]. Нам представляется заслуживающим внимания тот факт, что так называемый «ароматический домен» S-белка коронавируса SARS [47] также содержит CRAC-мотив (YIKWPWYVW) и что инфицирование этим коронавирусом зависит от холестерина [49]. Мы предполагаем, что создание CRAC-содержащих пептидов, конкурирующих с S-белком за холестерин и препятствующих процессу инфицирования клетки коронавирусом, может быть одним из направлений борьбы с этой

инфекцией. Более того, губительное действие коронавируса при его репликации и формировании оболочки вириона может быть подобно токсическому действию больших доз некоторых CRAC-содержащих пептидов (рис. 1в, 3в; [28]). Токсический эффект CRAC-содержащего коронавируса S-белка внутри клетки может быть связан с секвестрированием холестерина S-белком и нарушением работы холестерин-зависимых белков не только плазматической мембраны, но и мембран внутриклеточных органелл. Предотвратить такую губительную для клетки экстракцию холестерина S-белком также могут специально сконструированные и не обладающие токсичностью CRAC-содержащие пептиды.

В целом, полученные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что: (1) CRAC-мотивы играют существенную роль в механизме эффектов, вызываемых пептидом P4 (RTKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLR), содержащим два CRAC-мотива; (2) из мотивообразующих аминокислот принципиально присутствие ароматической аминокислоты триптофана, замена которого серином в обоих CRAC-мотивах инактивирует пептид; (3) замена катионных аминокислот (аргинина и лизина) не влияет на исследуемые эффекты пептида; (4) для токсического эффекта P4, по-видимому, существенно присутствие двух CRAC-мотивов; (5) эффекты CRAC-содержащих пептидов (P4, Mut4 и Mut1) зависят от содержания холестерина в мембране. Механизмы взаимодействий липидных и белковых компонентов клеточной мембраны с CRAC-содержащими пептидами, модулирующими холестерин-зависимые клеточные функции, а также возможности применения таких пептидов в медицинских целях еще предстоит исследовать.

Авторы выражают благодарность Л.А. Баратовой и В.А. Радюхиной за полезное обсуждение проекта. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-01363.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Enkavi G., Javanainen M., Kulig W., Róg T., Vattulainen I. 2019. Multiscale simulations of biological membranes: The challenge to understand biological phenomena in a living substance. *Chem. Rev.* **119**, 5607–5774.
- Song Y., Kenworthy A.K., Sanders Ch.R. 2014. Cholesterol as a co-solvent and a ligand for membrane proteins. *Protein Science*. **23**, 1–22.
- Ikonen E. 2008. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9** (2), 125–138.
<https://doi.org/10.1038/nrm2336>
- Muller M.P., Jiang T., Sun C., Lihan M., Pant S., Mahinthichaichan P., Trifan A., Tajkhorshid E. 2019. Characterization of lipid-protein interactions and lipid-mediated modulation of membrane protein function through molecular simulation. *Chem. Rev.* **119** (9), 6086–6161.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00608>
- Kiriakidi S., Kolocouris A., Liapakis G., Ikram S., Durdagi S., Mavromoustakos Th. 2019. Effects of cholesterol on GPCR function: Insights from computational and experimental studies. In: *Direct mechanisms in cholesterol modulation of protein function*. Eds Rosenhouse-Dantsker A., Bukiya A.N. Series *Advances in experimental medicine and biology*, vol. 1135. Cham: Springer, p. 89–103.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-14265-0_5
- Lundbæk J.A., Birn P., Hansen A.J., Søgaard R., Nielsen C., Girshman J., Bruno M.J., Tape S.E., Egebjerg J., Greathouse D.V., Mattice G.L., Koeppe R.E. II, Andersen O.S. 2004. Regulation of sodium channel function by bilayer elasticity: The importance of hydrophobic coupling. Effects of micelle-forming amphiphiles and cholesterol. *J. Gen. Physiol.* **123**, 599–621.
- Resnik N., de Luca GMR, Sepčić K., Romih R., Manders E., Veranić P. 2019. Depletion of the cellular cholesterol content reduces the dynamics of desmosomal cadherins and interferes with desmosomal strength. *Histochem Cell Biol.* **152** (3), 195–206.
<https://doi.org/10.1007/s00418-019-01797-1>
- Tabas I. 2010. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **10** (1), 36–46.
<https://doi.org/10.1038/nri2675>
- Sviridov D., Mukhamedova N., Makarov A.A., Adzhubei A., Bukrinsky M. 2020. Comorbidities of HIV infection: Role of Nef-induced impairment of cholesterol metabolism and lipid raft functionality. *AIDS*. **34**, 1–13.
- Tang Q., Wang F., Yang J., Peng H., Li Y., Li B., Wang S. 2020. Revealing a novel landscape of the association between blood lipid levels and Alzheimer's disease: A meta-analysis of a case-control study. *Front. Aging Neurosci.* **11**, 370.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00370>
- Singhal A., Szente L., Hildreth J.E.K., Song B. 2018. Hydroxypropyl-beta and -gamma cyclodextrins rescue cholesterol accumulation in Niemann-Pick C1 mutant cell via lysosome-associated membrane protein 1. *Cell Death Dis.* **9** (10), 1019.
<https://doi.org/10.1038/s41419-018-1056-1>
- Shi L., Huang L., He R., Huang W., Wang H., Lai X., Zou Z., Sun J., Ke Q., Zheng M., Lu X., Pei Z., Su H., Xiang A.P., Li W., Yao X. 2018. Modeling the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A using patient-specific iPSCs. *Stem Cell Reports*. **10** (1), 120–133.
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.11.013>
- Nayak D.P., Hui E.K. 2004. The role of lipid microdomains in virus biology. *Subcell Biochem.* **37**, 443–491.
- Carter G.C., Bernstone L., Sangani D., Bee J.W., Harder T., James W. 2009. HIV entry in macrophages is dependent on intact lipid rafts. *Virology*. **386**, 192–202.

15. Dou X., Li Y., Han J., Zarlenga D.S., Zhu W., Ren X., Dong N., Li X., Li G. 2018. Cholesterol of lipid rafts is a key determinant for entry and post-entry control of porcine rotavirus infection, *BMC Vet. Res.* **14** (1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1366-7>
16. Lafont F., van der Goot F.G. 2005. Bacterial invasion via lipid rafts. *Cellular Microbiol.* **7** (5), 613–620. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00515.x>
17. Gatfield J., Pieters J. 2000. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science.* **288**, 1647–1650.
18. Ouellet H., Johnston J.B., Ortiz de Montellano P.R. 2011. Cholesterol catabolism as a therapeutic target in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiol.* **19** (11), 530–539.
19. Viswanathan G., Jafurulla M., Kumar G.A., Raghunand T.R., Chattopadhyay A. 2015. Dissecting the membrane cholesterol requirement for mycobacterial entry into host cells. *Chemistry and Physics of Lipids.* **189**, 19–27.
20. Peyron P., Bordier C., N'Diaye E.-N., Maridonneau-Parini I. 2000. Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J. Immunol.* **165**, 5186–5191.
21. Sezgin E., Levental I., Mayor S., Eggeling C. 2017. The mystery of membrane organization: Composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 361–374.
22. Li H., Papadopoulos V. 1998. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinol.* **139**, 4991–4997
23. Papadopoulos V., Baraldi M., Guilarte T.R., Knudsen T.B., Lacapere J.J., Lindemann P.L., Norenberg M.D., Nutt D., Weizman A., Zhang M.R., Gavish M. 2006. Translocator protein (18kDa): New nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 402–409.
24. Fantini J., Epand R.M., Barrantes F. J. 2019. Cholesterol-recognition motifs in membrane proteins. In: *Direct mechanisms in cholesterol modulation of protein function*. Eds Rosenhouse-Dantsker A., Bukiya A.N. Series *Advances in experimental medicine and biology*, vol. 1135. Cham: Springer, p. 3–25. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14265-0_1
25. Miller C.M., Brown A.C., Mittal J. 2014. Disorder in cholesterol-binding functionality of CRAC peptides: A molecular dynamics study. *J. Phys. Chem. B.* **118**, 13169–13174.
26. Li H., Yao Z., Degenhardt B., Teper G., Papadopoulos V. 2001. Cholesterol binding at the cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** (3), 1267–1272.
27. Дунина-Барковская А.Я., Вишнякова Х.С., Головкин А.О., Арутюнян А.М., Баратова Л.А., Батищев О.В., Радюхин В.А. 2018. Амфипатические CRAC-содержащие пептиды-фрагменты белка М1 вируса гриппа модулируют холестерин-зависимую активность макрофагов IC-21. *Биохимия.* **83** (8), 1235–1246.
28. Дунина-Барковская А.Я., Вишнякова Х.С., Баратова Л.А., Радюхин В.А. 2019. Модуляция холестерин-зависимой активности макрофагов IC-21 пептидом, содержащим два CRAC-мотива из белка М1 вируса гриппа. *Биол. мембраны.* **36** (4), 271–280.
29. Дунина-Барковская А.Я., Вишнякова Х.С., Чешев Д.А., Чеканов Н.Н., Бужурина И.М. 2006. Действие диметилсульфоксида и холестерин-связывающих пептидов на фагоцитозную активность макрофагов IC-21. *Биол. мембраны.* **24**, 451–456.
30. Головкина М.С., Скачков И.В., Метелев М.В., Кузеванов А.В., Вишнякова Х.С., Киреев И.И., Дунина-Барковская А.Я. 2009. Угнетающее действие сыворотки на фагоцитозную активность макрофагов IC-21. *Биол. мембраны.* **26**, 379–386.
31. Вишнякова Х.С., Киреев И.И., Дунина-Барковская А.Я. 2011. Влияние плотности культуры на параметры фагоцитоза у макрофагов линии IC-21. *Биол. мембраны.* **28**, 387–396.
32. Ueda M.J., Ito T., Ohnishi S., Okada T.S. 1981. Phagocytosis by macrophages. I. Kinetics of adhesion between particles and phagocytes. *J. Cell Sci.* **51**, 173–188.
33. Han J., Hajjar D.P., Tauras J.M., Nicholson A.C. 1999. Cellular cholesterol regulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36. *J. Lipid. Res.* **40**, 830–838.
34. Febbraio M., Hajjar D.P., Silverstein R.L. 2001. CD36: A class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* **108**, 785–791. <https://doi.org/10.1172/JCI200114006>
35. Дунина-Барковская А.Я. 2004. Фагоцитоз – три в одном: эндоцитоз, экзоцитоз, адгезия. *Биол. мембраны.* **21**, 243–270.
36. Oh H., Mohler E.R., Tian A., Baumgart T., Diamond S.L. 2009. Membrane cholesterol is a biomechanical regulator of neutrophil adhesion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1290–1297.
37. Zidovetzki R., Levitan I. 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes.* **1768**, 1311–1324.
38. Kurkov S.V., Loftsson Th. 2013. Cyclodextrins. *Int. J. Pharmaceutics.* **453**, 167–180.
39. Leclercq L. 2016. Interactions between cyclodextrins and cellular components: Towards greener medical applications? *Beilstein J. Org. Chem.* **12**, 2644–2662.
40. Pike, L.J., and Miller, J.M. 1998. Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol biphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* **273**, 22298–22304.

41. Kumar G.A., Roy S., Jafurulla M., Mandal C., Chattopadhyay A. 2016. Statin-induced chronic cholesterol depletion inhibits *Leishmania donovani* infection: Relevance of optimum host membrane cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta.* 1858 (9), 2088–2096. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2016.06.010>
42. Koufos E, Chang EH, Rasti ES, Krueger E, Brown AC. 2016. Use of a cholesterol recognition amino acid consensus peptide to inhibit binding of a bacterial toxin to cholesterol. *Biochemistry.* **55** (34), 4787–4797.
43. Rout A.K., Wu X., Starich M.R., Strub M.-P., Hammer J.A., Tjandra N. 2018. The structure of melanoregulin reveals a role for cholesterol recognition in the protein's ability to promote dynein function. *Structure.* **26** (10), 1373–1383. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.07.009>
44. Brown A.C., Balashova N.V., Epand R.M., Epand R.F., Bragin A., Kachlany S.C., Walters M.J., Du Y., Boesze-Battaglia K., Lally E.T. 2013. Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin utilizes a cholesterol recognition/amino acid consensus site for membrane association. *J. Biol. Chem.* **288** (32), 23607–23621. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.486654>
45. Cheng G., Montero A., Gastaminza P., Whitten-Bauer C., Wieland S.F., Isogawa M., Fredericksen B., Selvarajah S., Gallay P.A., Ghadiri M.R., Chisari F.V. 2008. A viral
- cidal amphipathic α -helical peptide that inhibits hepatitis C virus infection in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 3088–3093. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712380105>
46. Gallay P.A., Chatterji U., Kirchhoff A., Gandarilla A., Pyles R.B., Baum M.M., Moss J.A. 2018. Protection efficacy of C5A against vaginal and rectal HIV challenges in humanized mice. *Open Virol. J.* **12**, 1–13. <https://doi.org/10.2174/1874357901812010001>
47. Corver J., Broer R., van Kasteren P., Spaan W. 2009. Mutagenesis of the transmembrane domain of the SARS coronavirus spike glycoprotein: Refinement of the requirements for SARS coronavirus cell entry. *Virol. J.* **6**, 230. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-230>
48. Azarashvili T., Krestinina O., Baburina Y., Odinkova I., Akatov V., Beletsky I., Lemasters J., Papadopoulos V. 2016. Effect of the CRAC peptide, VLNYVW, on mPTP opening in rat brain and liver mitochondria. *Int. J. Mol. Sci.* **17** (12). pii: E2096.
49. Glende J., Schwegmann-Wessels C., Al-Falah M., Pfefferle S., Qu X., Deng H., Drosten C., Naim H.Y., Herrler G. 2008. Importance of cholesterol-rich membrane microdomains in the interaction of the S protein of SARS-coronavirus with the cellular receptor angiotensin-converting enzyme 2. *Virology.* **381** (2), 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.08.026>

Modulation of the Cholesterol-Dependent Activity of Macrophages IC-21 by CRAC Peptides with Substituted Motive-Forming Amino Acids

A. Ya. Dunina-Barkovskaya^{1, *} and Kh. S. Vishnyakova²

¹Belozersky Institute of Physico-chemical Biology, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119992 Russia

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119191 Russia

*e-mail: dunina@belozersky.msu.ru

The activity of many membrane proteins, such as receptors, ionic channels, transporters, and enzymes, is cholesterol dependent; however, mechanisms of the cholesterol-dependent regulation of protein functions remain obscure. Recent studies suggest that membrane proteins can directly interact with cholesterol owing to the presence of the cholesterol-recognizing amino-acid consensus (CRAC) motifs. One of the ways to verify and further develop this notion is a design of CRAC-containing peptides and investigation of their effects on cholesterol-dependent cell functions. Previously we showed that a newly constructed peptide **RTKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLSR** (peptide P4) containing two CRAC motifs modulates cholesterol-dependent interactions of cultured macrophages IC-21 with 2- μ m particles. In this work, in order to clarify the role of CRAC-forming amino acids, we employed the same experimental system to test the activity of peptides closely related to P4 but with modified CRAC motifs. We found that peptide **STKLSEMLSELGNMDKASKLSRKLSR** (Mut2) analogous to P4, except that all CRAC-forming amino acids were substituted by serine (V $\rightarrow$ S, W $\rightarrow$ S, R $\rightarrow$ S), did not produce any effect in the concentration range 0.5–50 μ M corresponding to the range of the P4 activity. Neither was effective peptide **RTKLSEMLVELGNMDKAVKLSRKLSR** (Mut3), in which only aromatic amino acids of the CRAC motifs were substituted (W $\rightarrow$ S). Peptide **STKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLSR** (Mut4), in which only cationic amino acids in the CRAC motifs were changed (R/K $\rightarrow$ S), produced almost the same effect as that of peptide P4 with a bell-shape dose–response curve. At low concentrations (1–4 μ M) Mut4 notably increased the number of beads per cell, at higher concentrations this parameter diminished, and at 50 μ M Mut4 produced a robust toxic effect. Finally, peptide **EWGMAVLWERNRKLKDKLVKMLRT** (Mut1) composed of the same amino acid residues as P4 but in a random order (“scramble”) and possessing one CRAC motif, different from that in P4, produced a moderate stimulation at 4–10 μ M but was not toxic at 50 μ M. As in the case of peptide P4, the effects of Mut4 and Mut1 depended on the cholesterol content in the cell membrane: after the incubation of cells with cholesterol-extracting agent methyl- β -cyclodextrin stimulatory effects produced by Mut4 and Mut1 at low doses

were suppressed. Our results indicate that CRAC motifs play an important role in the mechanisms of the peptide-induced modulations of cholesterol-dependent cell functions in the experimental system used and that of the three motif-forming amino acids, critical is the presence of aromatic amino acids (W). Further research is required to comprehend the molecular mechanisms of interactions of CRAC-containing peptides with cell membrane components that lead to modulation of cell functions. We anticipate that CRAC-containing peptides may provide a basis for the development of new tools for directed regulation of the activity of target cholesterol-dependent membrane proteins and for the design of new antimicrobial and immunomodulating drugs in particular.

Keywords: peptides, cholesterol, cholesterol-recognizing amino-acid consensus, CRAC-motif, influenza virus protein M1, methyl- β -cyclodextrin, macrophages, phagocytosis, adhesion