

СТАТЬИ

УДК 575.162:612.67

ГЕРОПРОТЕКТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ХРОНОБИОТИКА KL001 В *IN VIVO* ЭКСПЕРИМЕНТАХ И ЕГО ВАЛИДАЦИЯ *IN SILICO*

^{1,2}Соловьёв И.А., ¹Шапошников М.В., ¹Москалев А.А.

¹ФГБУН Институт биологии ФИЦ Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, e-mail: ilyasolovev-ksc@yandex.ru;

²ФГБОУ ВО «Сыктывкарский государственный университет им. Питирима Сорокина», Сыктывкар

В настоящей работе проведено исследование сочетанных эффектов пан-нейрональной конститутивной экспрессии гена *cry* и применения хронобиотика KL001 в геропротекторной концентрации 5 мкМоль/мл на модели *Drosophila melanogaster*. Гипотеза: KL001 стабилизирует криптохром и увеличивает горметический эффект его сверхэкспрессии. Экспериментально установлено, что соединение KL001 нивелирует ранее описанный эффект продления жизни при конститутивной сверхэкспрессии криптохрома в нервной системе, что свидетельствует не об активирующих, а скорее об ингибирующих свойствах препарата при взаимодействии с белком dCRY. Методом компьютерного моделирования при помощи программы AmDock (AutoDock Vina) проведен сравнительный анализ межмолекулярных взаимодействий различных лигандов криптохрома, обнаружено высокое сродство KL001 к криптохрому дрозофила (в наиболее энергетически выгодной позиции аффинность равна -8.2 ккал/моль), рассчитана константа ингибирования (975.81 нмоль). Полученный результат указывает на то, что описанные ранее эффекты продления жизни дрозофил являются результатом функционирования криптохром-независимых механизмов продления жизни, индуцированных приемом KL001. На основании полученных данных следует признать существование альтернативных механизмов продления жизни, запускаемых препаратом KL001, рассматривавшимся прежде исключительно как лиганд криптохрома.

Ключевые слова: хронобиотики, криптохром, старение, дрозофила, молекулярный докинг

GEROPROTECTIVE POTENTIAL OF CHRONBIOTIC KL001 *IN VIVO* AND *IN SILICO*

^{1,2}Solovev I.A., ¹Shaposhnikov M.V., ¹Moskalev A.A.

¹Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, e-mail: soloviev@ib.komisc.ru;

²Pitirim Sorokin Syktyvkar State University, Syktyvkar

In the present work, we studied the combined effects of pan-neuronal constitutive expression of the *cry* gene and the use of the chronobiotic KL001 in geroprotective ml 5 μM on *Drosophila melanogaster* as a model animal. Hypothesis: KL001 stabilizes cryptochrome and increases the hormetic effect of its overexpression. It was experimentally established that the compound KL001 neutralizes the previously described effect of prolonging life during constitutive overexpression of cryptochrome in the nervous system, which indicates not activating, but rather inhibiting properties of the drug when interacting with the dCRY protein. A comparative analysis of the intermolecular interactions of various ligands of cryptochrome was carried out using the method of computer simulation using the AmDock program (AutoDock Vina), a high affinity of KL001 for the cryptochrome of *Drosophila* was found (in the most energetically favorable position, the affinity is -8.2 kcal / mol), an inhibition constant is 975.81 nmol. The obtained result indicates that the previously described effects of prolonging the life of *Drosophila* are induced by cryptochrome-independent mechanisms of life extension, boosted by the intake of KL001.

Keywords: chronobiotics, cryptochrome, aging, *Drosophila*, molecular docking

Группа экспериментальных препаратов, называемых хронобиотиками, представляет собой структурно разнородную совокупность малых молекул, показавших в экспериментах высокую эффективность в отношении циркадного ритма экспрессии генов на модельных объектах или в культуре. В список мишеней хронобиотиков главным образом входят именно белки-компоненты молекулярного механизма клеточных часов, поддерживающих осцилляции циркадного ритма. Среди хронобиотиков следует выделить два типа, прямые и опосредованные, и несколько наиболее крупных классов в зависимости от мишени внутри первого типа: лиганды казеин киназ, лиганды криптохро-

мов, лиганды ROR-рецепторов, соединения, связывающие REV-ERB и ингибиторы GSK-3 [1, 2].

Ингибиторы казеин киназ представлены лонгдейзином, DK359, NCC007, PF4800567, эпибластинами A and C (лиганды СК I) [1] и DMAT, TBV, CX-4945, GO289 (лиганды СК II) [1]. GSK-3-специфичные ингибиторы представлены CHIR99021, BRD1652. Инте-ракторы рецепторов RORs представлены в основном соединениями-агонистами: нобилетином, нейрорускогенином, T0901317, SR1001, SR2211, SR1555, SR3335 и SR1078. Подгруппа активаторов криптохрома включает KL001, Compound 50, KL044, GO200, KL101, TH301 и др., в то время как в под-

группу ингибиторов входят KS15-дериваты и неэтоксипропановые производные [2, 3].

Непрямые хронобиотики гораздо более многочисленны и разнородны, отличает их от прямых то, что для них не установлена конкретная мишень (компонент клеточных часов), которая модифицирует циркадный ритм при связывании с молекулой-лигандом. Среди непрямых хронобиотиков можно выделить модуляторы фототрансдукторного каскада (опсинамиды и ингибиторы меланопсина), неспецифичные ингибиторы GSK-3 (литий и производные бензодиазипина), индукторы экспрессии Bmal1 (L-methyl selenocysteine), активаторы Sirt, такие как ресвератрол (спорная подгруппа, поскольку у млекопитающих Sirt вовлечен в осциллятор, как второстепенный элемент механизма; существуют также хронобиотики, для которых мишени вообще не описаны, например «Compound 10/СЕМЗ»). Стоит отметить, что геропротекторный потенциал был описан лишь у лития и производных бензодиазепина [4, 5].

Активатор криптохрома был избран в качестве объекта исследования в силу его способности модифицировать экстракулярную фоторецепцию. В качестве гипотезы мы выбрали утверждение, что стабилизация криптохрома дрозофилы dCRY продлевает жизнь плодовой мухи при сверхэкспрессии гена *cry*. Чтобы проверить гипотезу, решено было использовать KL001, активатор криптохрома [5]. Дрозофилиный криптохром dCRY был избран в качестве мишени из-за существования экспериментальных доказательств наличия геропротекторного эффекта генетических вмешательств в экспрессию гена *cry* [6].

Цель исследования: проверить способность KL001 модифицировать эффект продления жизни, вызванный пан-нейрональной конститутивной экспрессией гена *cry* у самцов дрозофилы; провести компьютерное моделирование взаимодействия белка-мишени dCRY с лигандом KL001.

Материалы и методы исследования

Линия *y, w; UAS-cry24/CyO* (трансген располагается на 2 хромосоме, присутствуют две копии) – обе конструкции являются несущими дополнительные копии гена *cry* (криптохром) в сопровождении промоторной последовательности *UAS* (*upstream activating sequence*). В эксперименте использовались линии дрозофил с выровненным в течение шести поколений генетическим фоном: линия *UAS-cry24* и линия *tim-GAL4-64* (генотип: *w; tim-GAL4-64/+*). Для выравнивания генетического фона ис-

пользовали линию *w¹¹¹⁸*. Самцов драйверной линии *tim-GAL4* скрещивали с виргинными самками *UAS-cry24* для получения особей, сверхэкспрессирующих ген *cry* в нервной системе. В качестве генетического контроля использовали особей родительских линий *tim-GAL4* и *UAS-cry24*.

Климатические установки Binder KBF720-ICH (Binder, Германия) использовались для содержания экспериментальных животных. Температура поддерживалась постоянно на уровне 25 °С, относительная влажность воздуха составляла 60%. В зависимости от варианта эксперимента использовалось два режима освещения: 12 ч свет и 12 ч темнота (нормальный), 24 ч темнота.

Особи из контрольной и опытных групп перемещались на свежую питательную среду одновременно, дважды за неделю до конца жизни. Навеска сухих компонентов питательной среды в расчете на 1 л воды: 30 г – сахарный песок, 30 г – манная крупа, 8 г – сухие дрожжи, 7 г – агар-агар по 8 мл – 50% пропионовая кислота (водный раствор) и 10% раствор нипагина в 96%-ном этаноле.

Статистическая обработка результатов экспериментов по оценке выживаемости проводилась в приложении OASIS 2 [7].

Для изучения эффектов активатора криптохрома наносили 30 мкл раствора KL001 (Sigma-Aldrich, USA) в дистиллированной воде и 0,1% DMSO в концентрациях 5 мкмоль/мл на поверхность питательной среды дрозофил. На среду контрольной группы животных наносили 30 мкл 0,1% DMSO, в отрицательном контроле использовалась дистиллированная вода.

Анализ взаимодействий молекул рибофлавина, ФАД, KL001 и KS15 с криптохромом и ионом Mg^{2+} (pH = 7,4) проводили в графическом интерфейсе AmDock [8] на базе программ AutoDock Vina. Файл с координатами атомов криптохрома дрозофилы и иона Mg^{2+} был загружен из базы данных PDB под кодовым номером 4gu5.

Результаты исследования и их обсуждение

Данные, полученные при проведении эксперимента по подсчету продолжительности жизни самцов дрозофил, получавших KL001 в дозе 5 мкмоль/мл и одновременно экспрессирующих конструкт *UAS-cry24/CyO / tim-GAL4-64* (пан-нейрональная конститутивная экспрессия криптохрома), показали, что препарат KL001 в сочетании с растворителем 0,1% DMSO нивелирует геропротекторный эффект ^{водн} сверхэкспрессии криптохрома. В значительной степени в отрицательном контроле выражен эффект самой сверхэкспрессии, который воспроиз-

водится относительно более ранних исследований, однако в опытной группе, которая получала все воздействия (препарат, растворитель, воду, сверхэкспрессию), статистически значимых различий с контролем, не сверхэкспрессировавшим криптохром, не обнаружено. Однако следует отметить, что KL001 в некоторой степени нивелирует отрицательное воздействие растворителя. Особи гибридного генотипа (*UAS-cry24/CyO / tim-GAL4-64*), получавшие препарат, по сравнению с особями контрольной группы, имевшими тот же генотип и получавшими DMSO, обнаруживают геропротекторный эффект (увеличение медианной продолжительности жизни на 34%, $p < 0,0001$). Обнаруженный эффект стоит признать несущественным, поскольку при сравнении подопытной группы с отрицательным контролем (вода) по тому же генотипу *UAS-cry24/tim-GAL4-64*, наблюдается снижение медианной продолжительности жизни на 17%. Таким образом, KL001 в присутствии растворителя, 0,1% раствора DMSO_{водн}, способен полностью отключать механизм продления жизни, опосредованный сверхэкспрессией криптохро-

ма у дрозофил (табл. 1). Следует признать, что геропротекторный эффект KL001, показанный ранее на диком типе линии *Canton-S*, является следствием криптохром-независимых механизмов, так как KL001, вероятно, выступает ингибитором дрозофилиного криптохрома и инактивирует его [9]. Последнее утверждение мы попытались доказать методом молекулярного докинга *in silico* (табл. 2).

Следует заключить, что наивысшей аффинностью при учете минимальной эффективной концентрации по отношению к дрозофилиному криптохрому обладает молекула KL001 (рис. 1), в силу максимального сходства с нативным (референсным) лигандом ФАД (рис. 2), второе место занимает соединение KS15 (рис. 3), ингибирующее криптохром дрозофилы в микромолярных концентрациях.

Низкая константа ингибирования и высокая аффинность KL001 (табл. 2) обнаруживают высокий ингибиторный потенциал соединения, что указывает на криптохром-независимые механизмы в качестве основной причины продления жизни самцов в более ранней работе [9].

Таблица 1

Параметры продолжительности жизни самцов дрозофилы, сверхэкспрессировавших криптохром и получавших KL001 с пищей

№ варианта	Генотип и воздействие, самцы	N	Параметры средней		Процентили смертности			
			Средняя ПДЖ	Ст. ош. средней	25%	50%	75%	90%
1.	<i>tim-GAL4-64 / tim-GAL4-64 + KL001 5 мкМоль/мл</i>	181	39,60	0,60	34	41	48	–
2.	<i>UAS-cry24/CyO / tim-GAL4-64 + KL001 5 мкМоль/мл</i>	155	55,75	0,70	55	55* ⁺	62	64
3.	<i>UAS-cry24/CyO / UAS-cry24/CyO + KL001 5 мкМоль/мл</i>	166	56,66	0,89	48	58	68	69
4.	<i>tim-GAL4-64 / tim-GAL4-64 + 0.1% DMSO_{водн}</i>	151	22,61	0,61	15	22	29	32
5.	<i>UAS-cry24/CyO / tim-GAL4-64 + 0.1% DMSO_{водн}</i>	163	39,64	0,78	34	41* [#]	48	52
6.	<i>UAS-cry24/CyO / UAS-cry24/CyO + 0.1% DMSO_{водн}</i>	153	32,06	0,88	24	31	41	45
7.	<i>tim-GAL4-64 / tim-GAL4-64 + H₂O</i>	190	40,66	0,93	39	45	48	51
8.	<i>UAS-cry24/CyO / tim-GAL4-64 + H₂O</i>	171	66,57	1,30	55	66 ^s	79	92
9.	<i>UAS-cry24/CyO / UAS-cry24/CyO + H₂O</i>	214	58,07	1,02	50	60	67	78

Примечания: * – $p < 0,0001$ (сравнение вариантов 2 и 5; 2 и 8; согласно критерию Гехана – Бреслоу – Уилкоксона с поправкой Бонферрони); + – $p < 0,001$ (сравнение вариантов 2 и 1; 5 и 4; 5 и 6; согласно критерию Гехана – Бреслоу – Уилкоксона с поправкой Бонферрони); ^s – $p < 0,001$ (сравнение вариантов 8 и 7; 8 и 9; согласно критерию Гехана – Бреслоу – Уилкоксона с поправкой Бонферрони); [#] – $p < 0,0001$ согласно критерию Гехана – Бреслоу – Уилкоксона с поправкой Бонферрони, сравниваются варианты 5 и 8.

Таблица 2

Сравнение результатов молекулярного докинга ФАД и хронобиотиков KL001 и KS15 с молекулой белка dCRY

№	ФАД (Референсный нативный лиганд-кофактор)				KL001				KS15			
	Аффинность	Ki	Единицы измерения	Эффективность лиганда	Аффинность	Ki	Единицы измерения	Эффективность лиганда	Аффинность	Ki	Единицы измерения	Эффективность лиганда
1	-16,4	0,0	нмоль	-0,31	-8,2	975,81	нмоль	-0,29	-7,3	4,46	мкмоль	-0,28
2	-16,4	0,0	нмоль	-0,31	-8,1	1,16	мкмоль	-0,29	-7,1	6,25	мкмоль	-0,27
3	-16,2	0,0	нмоль	-0,3	-7,9	1,62	мкмоль	-0,28	-7,1	6,25	мкмоль	-0,27
4	-16,2	0,0	нмоль	-0,31	-7,9	1,62	мкмоль	-0,28	-7,1	6,25	мкмоль	-0,27
5	-16,0	0,0	нмоль	-0,3	-7,8	1,92	мкмоль	-0,28	-6,8	10,37	мкмоль	-0,26

Примечание. Ki – константа ингибирования.

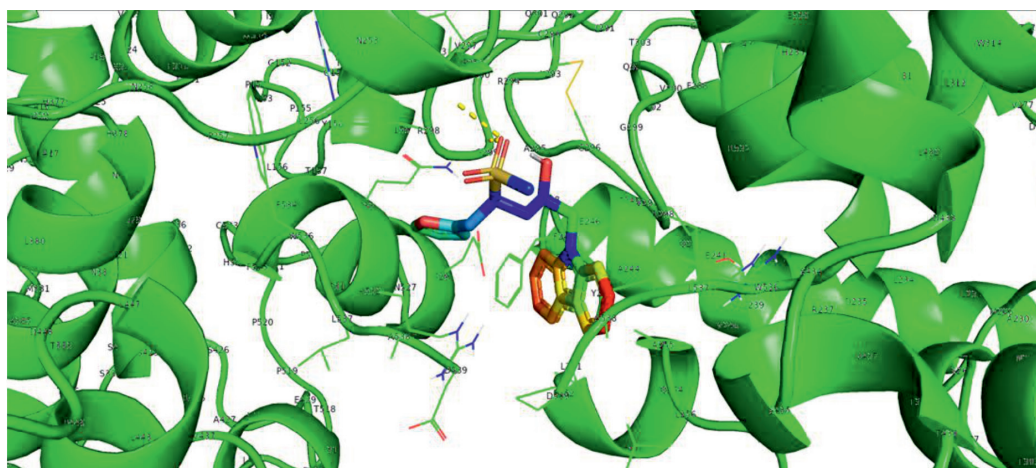


Рис. 1. KL001 взаимодействует с dCRY в кратере, связывающем ФАД

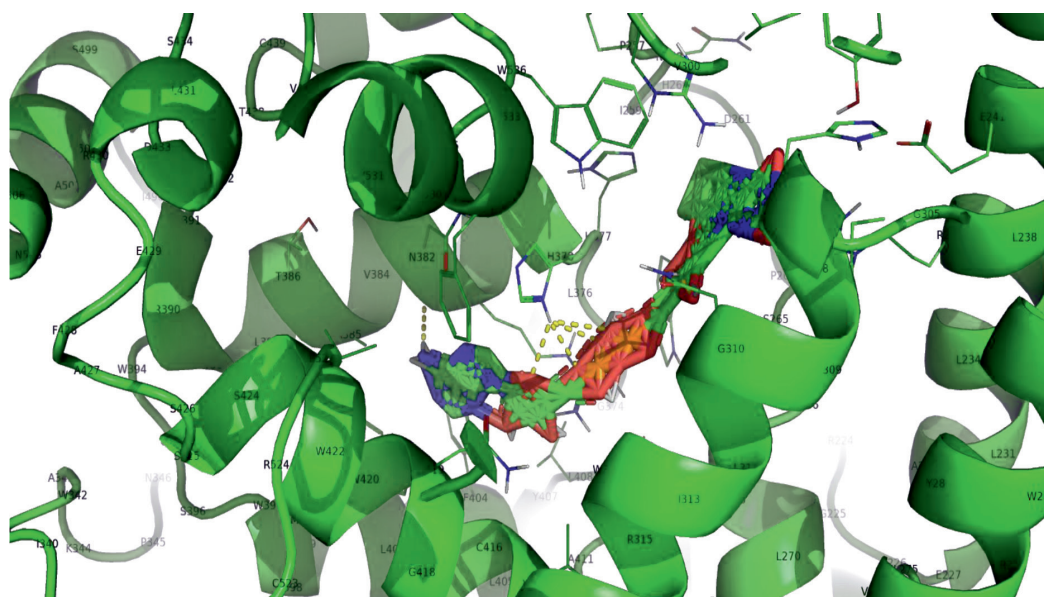


Рис. 2. Модель взаимодействия молекул ФАД с dCRY в энергетически наиболее выгодных позициях

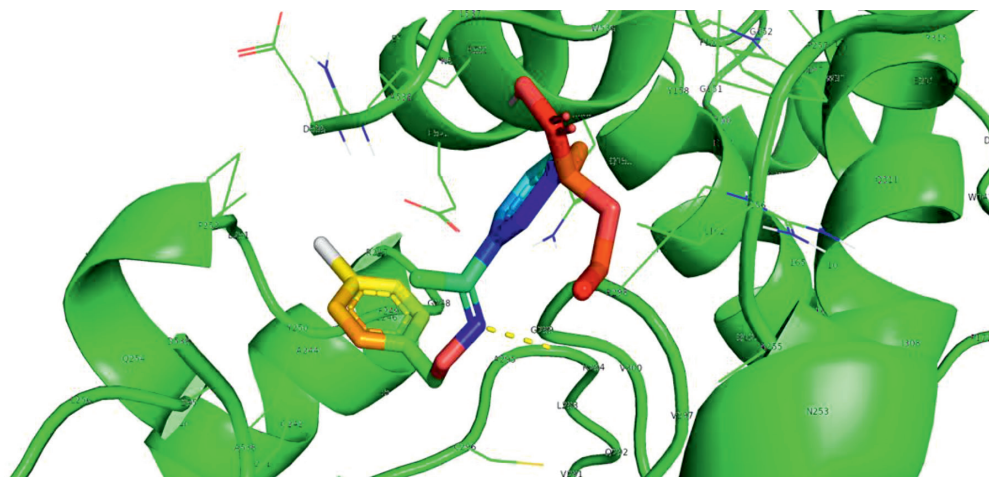


Рис. 3. KS15 взаимодействует с dCRY в кратере, связывающем ФАД

Описано множество вариантов докинга ФАД, имеющих практически равную свободную энергию взаимодействия (от -16.0 до -16.4 ккал на рис. 3 представлены первые пять позиций из табл. 2).

Заключение

Эффект продления жизни в условиях сверхэкспрессии гена, кодирующего мишень KL001, белок dCRY не сохраняется относительно отрицательного контроля (тот же генотип, особи получали воду с пищей), хотя в опыте относительно группы с тем же генотипом, подвергавшейся воздействию растворителя (0,1% ДМСО) увеличение медианной продолжительности жизни наблюдалось существенное (+34%, $p < 0,0001$).

1. Результаты моделирования взаимодействий белка dCRY с различными лигандами указывают на KL001 как на препарат, имеющий максимальное сродство с криптохромом дрозофилы (в сравнении с нативным кофактором ФАД), аффинность -8,2 ккал/моль, эффективная концентрация ингибирования 975,81 нмоль, эффективность лиганда - 0,29 (следует считать приемлемой).

2. Высокий ингибирующий потенциал KL001 свидетельствует о существовании криптохром-независимых механизмов продления жизни, индуцированных KL001 в более ранних экспериментах, так в настоящем исследовании эффект продления жизни самцов сверхэкспрессией криптохрома нивелируется употреблением экспериментальными животными в пищу KL001 в концентрации 5 мкМоль/мл (дозе, имеющей геропротекторные свойства).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90058 «Аспиранты»: «Исследование геропротекторных свойств

стабилизатора и ингибитора криптохрома, KL001 и KS15, на модели Drosophila melanogaster». Исследования выполнены в рамках государственного задания по теме «Разработка геропротекторных и радиопротекторных препаратов», № АААА-А19-119021590022-2.

Список литературы

1. Miller S., Hirota T. Pharmacological interventions to circadian clocks and their molecular bases. *Journal of molecular biology*. 2020. Vol. 432. No. 12. P. 3498–3514. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.01.003.
2. Ribeiro R.F., Cavadas C., Silva M.M.C. Small-molecule modulators of the circadian clock: pharmacological potentials in circadian-related diseases. *Drug Discovery Today*. 2021. DOI: 10.1016/j.drudis.2021.03.015.
3. Jeong Y.U., Jin H.E., Lim H.Y., Choi G., Joo H., Kang B., Lee G.H., Liu K.H., Maeng H.J., Chung S., Son G.H. Development of Non-Ethoxypropanoic Acid Type Cryptochrome Inhibitors with Circadian Molecular Clock-Enhancing Activity by Bioisosteric Replacement. *Pharmaceuticals*. 2021. Vol. 14. No. 6. P. 496. DOI: 10.3390/ph14060496.
4. Castillo-Quan J.I., Tain L.S., Kinghorn K.J., Li L., Grönke S., Hinze Y., Blackwell T.K., Bjedov I., Partridge L. A triple drug combination targeting components of the nutrient-sensing network maximizes longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019. Vol. 116. No. 42. P. 20817–20819. DOI: 10.1073/pnas.1913212116.
5. Chen Z., Yoo S.H., Takahashi J.S. Small molecule modifiers of circadian clocks. *Cellular and molecular life sciences*. 2013. Vol. 70. No. 16. P. 2985–2998. DOI: 10.1007/s00018-012-1207-y.
6. Solovov I., Dobrovolskaya E., Shaposhnikov M., Sheptyakov M., Moskalev A. 2019. Neuron-specific overexpression of core clock genes improves stress-resistance and extends lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Experimental gerontology*. 2019. Vol. 117. P. 61–71. DOI: 10.1016/j.exger.2018.11.005.
7. Han S.K., Lee D., Lee H., Kim D., Son H.G., Yang J.S., Lee S.J.V., Kim S. OASIS 2: online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research. *Oncotarget*. 2016. Vol. 7. No. 35. P. 56147. DOI: 10.18632/oncotarget.11269.
8. Valdés-Tresanco M.S., Valdés-Tresanco M.E., Valiente P.A., Moreno E., 2020. AMDock: a versatile graphical tool for assisting molecular docking with Autodock Vina and Autodock4. *Biology direct*. 2020. Vol. 15. No. 1. P. 1–12. DOI: 10.1186/s13062-020-00267-2.
9. Solovov I.A., Shaposhnikov M.V., Moskalev A.A. Chronobiotics KL001 and KS15 extend lifespan and modify circadian rhythms of *Drosophila melanogaster*. *Clocks & Sleep*. 2021. Vol. 3. No. 3. P. 429–441. DOI: 10.3390/clockssleep3030030.