

ISSN 0132-3423

Том 50, Номер 4

Июль - Август 2024



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 50, номер 4, 2024

Юрий Анатольевич Овчинников и я. Большое видится на расстоянии (мемориальный обзор) <i>Е. Д. Свердлов</i>	351
Методы введения флуоресцентной метки в полисахариды (обзорная статья) <i>А. Ю. Нокель, Н. В. Бовин, А. Б. Тузиков, Т. В. Овчинникова, Н. В. Шилова</i>	359
Архитектоника убиквитиновых цепей (обзорная статья) <i>К. А. Иванова, А. А. Белогуров, А. А. Кудряева</i>	379
Трансмембранные домены биотопных белков – ключ к пониманию клеточной сигнализации (обзорная статья) <i>А. А. Полянский, Р. Г. Ефремов</i>	398
Перспективные направления регулирования сигнальных путей, участвующих в развитии сахарного диабета второго типа (обзорная статья) <i>Н. А. Бороздина, Д. В. Попкова, И. А. Дьяченко</i>	412
Биохимия редокс-активных соединений серы в клетках млекопитающих и подходы к их детекции (обзорная статья) <i>Р. И. Раевский, В. А. Катруха, Ю. В. Храмова, Д. С. Билан</i>	436
Современные методы флуоресцентной наноскопии в биологии (обзорная статья) <i>Д. О. Соловьева, А. В. Алтунина, М. В. Третьяк, К. Е. Мочалов, В. А. Олейников</i>	462
Биотехнологический способ получения рекомбинантного двухкомпонентного лантибиотика лихеницидина в бактериальной системе экспрессии <i>Д. В. Антошина, С. В. Баландин, А. А. Тагаев, А. А. Потемкина, Т. В. Овчинникова</i>	485
Производное нейротоксина ВеМ9 раскрывает особенности взаимодействия с изоформой натриевых каналов $Na_v1.5$ <i>М. А. Черных, М. А. Дюжева, Н. А. Кульдюшев, С. Пеньёр, А. А. Беркут, Я. Титгат, А. А. Василевский, А. О. Чугунов</i>	498
Сверхбыстрая фотохимическая реакция родопсина <i>Exiguobacterium sibiricum</i> (ESR) при щелочном значении pH <i>О. А. Смитиенко, Т. Б. Фельдман, Л. Е. Петровская, Е. А. Крюкова, И. В. Шелаяев, Ф. Е. Гостев, Д. А. Черепанов, И. Б. Кольчугина, Д. А. Долгих, В. А. Надточенко, М. П. Кирпичников, М. А. Островский</i>	508
Влияние пептидных линкеров на функциональные свойства гибридных структур с избирательным pH-зависимым связыванием с раковыми клетками <i>А. Ю. Фролова, А. А. Пахомов, С. М. Деев, В. И. Мартынов</i>	517
Влияние эффекторов на каталитическую активность галактонолактонооксидазы из <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>А. А. Чудин, Е. В. Кудряшова</i>	526

Синтетические антимикробные пептиды. V. Гистидин-содержащие антигрибковые пептиды с “линейным” типом амфипатичности

Н. В. Амирханов, А. В. Бардашева, В. Н. Сильников, Н. В. Тикунова

538

Фоторасщепляемые направляющие РНК для фоторегулируемой системы CRISPR/Cas9

*Е. А. Ахметова, И. П. Вохтанцев, М. И. Мецанинова, М. А. Воробьева,
Д. О. Жарков, Д. С. Новопашина*

556

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

Сравнительный анализ поведения Су5-пиримидиновых нуклеотидов в реакции амплификации по типу катящегося кольца

С. А. Лапа, П. А. Чиркова, С. А. Суржиков, В. Е. Кузнецова, В. Е. Шершов, А. В. Чудинов

568



УДК 577.1

ЮРИЙ АНАТОЛЬЕВИЧ ОВЧИННИКОВ И Я. БОЛЬШОЕ ВИДИТСЯ НА РАССТОЯНИИ

© 2024 г. Е. Д. Свердлов* #

* Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт»,
Россия, 123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 1

Поступила в редакцию 13.03.2024 г.

После доработки 27.03.2024 г.

Принята к публикации 28.03.2024 г.

Я во многих популярных статьях говорил о Юрии Анатольевиче. У меня с ним более 30 общих публикаций. В частности, более десяти – по РНК-полимеразе; пять – по АТФ-азе, одна (из трех) посвящена фотоаффинной модификации активных центров РНК-полимеразы; восемнадцать статей и патентов по интерферонам, в десяти из которых участвует Юрий Анатольевич: шесть наиболее существенных, семь статей и патентов (в трех из которых участвует Юрий Анатольевич) посвящены проблеме вакцины против вируса гепатита А.

Я был в составе команды, получившей Государственную премию СССР в 1981 г. за работы по РНК-полимеразе, возглавлявшиеся Юрием Анатольевичем. Также следует отметить, что при активном содействии Ю. А. Овчинникова было организовано промышленное производство интерферона, который я назвал Реаферон (рекомбинантный альфа интерферон), и я вместе другими участниками этой непростой работы был удостоен Ленинской премии. Реаферон продается в аптеках по сей день и будет в употреблении еще очень долго. Я привел эти данные, чтобы было ясно, насколько у нас было тесное сотрудничество.

Ключевые слова: биоорганическая химия

DOI: 10.31857/S0132342324040016, EDN: MNHPGO

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	351
2. ЗНАКОМСТВО В УНИВЕРСИТЕТЕ. ЮРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ АРБУЗОВ. МОЕ ПОЯВЛЕНИЕ В ИХПС	352
3. Я В ИХПС. НАЧАЛО РАБОТ ПО СТРУКТУРЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. РОЖДЕНИЕ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ. СОЗДАНИЕ ГРУППЫ БИОТЕХНОЛОГИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ	353
4. НАЧАЛО ИССЛЕДОВАНИЙ СТРУКТУР РНК-ПОЛИМЕРАЗ	353
5. ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЦЕНТРОВ РНК И ДНК-ПОЛИМЕРАЗ	354
6. АФГАНСКИЙ ЭПИЗОД	355
7. НОВОЕ ЗДАНИЕ ИБХ НА УЛИЦЕ МИКЛУХО-МАКЛАЯ. ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЙ БЛОК	356
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	356

1. ВВЕДЕНИЕ

Я во многих популярных статьях говорил о Юрии Анатольевиче. У меня с ним более 30 общих публикаций. В частности: более десяти – по РНК-полимеразе: [1–10], пять – по АТФ-азе [11–15], одна – [10] (из трех – [10, 16, 17]) пос-

вящена фотоаффинной модификации активных центров РНК-полимеразы. 18 статей и патентов по интерферонам, в 10 из которых участвует Юрий Анатольевич: 6 наиболее существенных: [18–23], 7 статей и патентов (в трех из которых участвует Юрий Анатольевич) посвящены проб-

Автор для связи: (эл. почта: edsverd@gmail.com).

леме вакцины против вируса гепатита А, четыре – наиболее существенных [27–30].

Я был в составе команды, получившей Государственную премию СССР в 1981 г. за работы по РНК-полимеразе, возглавлявшиеся Юрием Анатольевичем. Также следует отметить, что при активном содействии Ю. А. Овчинникова было организовано промышленное производство интерферона, который я назвал Реаферон (рекомбинантный альфа интерферон), и я вместе другими участниками этой непростой работы был удостоен Ленинской премии. Реаферон продается в аптеках по сей день и будет в употреблении еще очень долго. Я привел эти данные, чтобы было ясно, насколько у нас было тесное сотрудничество.

2. ЗНАКОМСТВО В УНИВЕРСИТЕТЕ. ЮРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ АРБУЗОВ. МОЕ ПОЯВЛЕНИЕ В ИХПС

Знакомство наше началось где-то между 1956 и 1960 годами, когда мы жили в общежитии студентов-химиков в МГУ зоне “Ж” на Ленинских горах. Мы оба активно участвовали в общественной работе я – в факультетском бюро ВЛКСМ, а он, насколько я помню, в студенческом комитете.

Мы часто общались и, как мне кажется, у нас установились дружеские взаимоотношения. Кроме того, он работал в лаборатории выдающегося человека – Юрия Александровича Арбузова, а там работали также два человека с нашего курса – Женя Климов и Лена Берестнева. Я часто забегал к ним и встречал там Юру (интересуясь этим периодом жизни Ю. А. Арбузова и Ю. А. Овчинникова, я нашел их совместную работу с М. М. Шемякиным [31] образца 1960 г. Я в это время был на 4-м курсе химфака МГУ).

Несколько слов обязательно надо сказать о Ю. А. Арбузове. Он из семьи знаменитого химика – Александра Ерминингельдовича Арбузова, создавшего Казанскую школу химиков, где интенсивно развивалась фосфорорганическая химия. Юрий Александрович обладал феноменальной памятью – на химфаке считали, что он практически наизусть помнил все соединения, описанные в фундаментальном многотомнике Бейльштейна. Его памятью пользовался Президент АН СССР Александр Николаевич Несмеянов, когда ему срочно была нужна информация по какому-нибудь соединению.

Он любил подшучивать над студентами. На первом же зачете по органической химии он спрашивал всех, как зовут его отца. Никто не знал этого сложного имени Александр Ерминингельдович. И Арбузов всех выгнал с зачета. Зато теперь все мы это помним. И еще он влюблялся в талантливых учеников и, в частности, в Овчинникова и в Климова. Всячески им помогал и много с ними беседовал.

В 1959 г. был образован Институт химии природных соединений (ИХПС, впоследствии – Институт биоорганической химии), куда пошли работать многие мои друзья. В частности, один из них – Всеволод Николаевич Бочкарев (ныне покойный) – любил рассказывать, что он был первым сотрудником этого Института. Поскольку научных ставок еще не было, он был зачислен истопником.

Интересна предыстория этого института. До сих пор на фронтоне здания на улице Вавилова красуется надпись “Институт горного дела Академии Наук”. Однако, в конце пятидесятых, Никита Сергеевич Хрущёв занялся проблемой сближения науки и производства. Институт горного дела был переведён в ближайшее Подмосковье, здание освободилось. Как раз в это время борьба с лысенковщиной приближалась к победному концу и было решено создать два института: Институт химии природных соединений (ИХПС, впоследствии – Институт биоорганической химии) и Институт радиационной и физико-химической биологии (ИРФХБ, впоследствии – Институт молекулярной биологии), который мы, шутя, называли ФРГ. Институты поделили здание пополам: в левой его части, если стоять лицом к институту, располагалась ФРГ, а в правой – ИХПС. Институты тесно сотрудничали. Директором ИРФХБ был выдающийся академик Владимир Александрович Энгельгардт, а ИХПС возглавлял академик Михаил Михайлович Шемякин.

Когда в 1965 г. я оканчивал аспирантуру химфака, и передо мной стоял вопрос – куда податься, Михаил Александрович Грачев, мой друг и сотрудник ИХПС, решил уехать в Новосибирск с семьей, и я пошел на его ставку в ИХПС в лабораторию Н. К. Кочеткова в группу нуклеотидов, которой руководил Эдуард Израилевич Будовский.

Первым знакомым, которого я увидел в ИХПС, был Юрий Анатольевич – с противогоазом через

плечо руководил занятиями по гражданской обороне. Помню, как он, увидев меня, заговорщически мне подмигнул. В 1970 году академик Шемякин скончался, и Юрий Анатольевич стал директором. А меня в 1969 году Ученый совет ИХПС избрал старшим научным сотрудником. Это была высокая честь – на конкурсе на эту должность претендовали несколько очень достойных сотрудников.

3. Я В ИХПС. НАЧАЛО РАБОТ ПО СТРУКТУРЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. РОЖДЕНИЕ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ. СОЗДАНИЕ ГРУППЫ БИОТЕХНОЛОГИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В это время я вместе со своим шефом Эдуардом Израилевичем Будовским изучал механизмы мутагенного действия гидроксилamina, параллельно изучал новую для меня область, в которую попал, посещая школы по молекулярной биологии в Дубне и начинал понимать, какие первоочередные задачи стоят перед химией нуклеиновых кислот. В 1965 г. американский биохимик Р. Холли установил структуру аланиновой тРНК длиной 76 нуклеотидов из дрожжей. Он разделил Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 1968 году (вместе с Хар Гобиндом Хорана и Маршаллом Ниренбергом). Рядом в ИМБ лаборатория А. А. Баева активно работала над структурой валиновой т-РНК и закончила ее в 1967 г. А в промежутке (1966) мой будущий хороший товарищ Ханс Цахау из Мюнхена установил структуру сериновой т-РНК из дрожжей. Работа над структурами РНК кипела, и мне было ясно, что адекватного метода ее установления нет. В один прекрасный день я придумал принцип, на котором мог бы основываться такой метод [24, 25], и стал заниматься, наряду с прежними работами, с Будовским, анализом структуры ДНК.

Как раз в это время в 1972 году Пол Берг в Стэнфордском университете получил первую рекомбинантную ДНК. В 1980 году Берг был удостоен Нобелевской премии по химии. Тогда и началась эпоха генной инженерии. С ним получил премии Уолтер Гилберт и Фредерик Сенгер. Они создали методы установления первичной структуры ДНК, основанные на том же принципе, что был описан нами в 1972–1973 гг. С от-

крытием Берга генная инженерия начала активно разрабатываться в мире и, где-то в 1977 году, Ю. А. Овчинников предложил мне создать такую группу в ИБХ. Группа под названием “Группа биотехнологии нуклеиновых кислот” была создана. К ней присоединились В. А. Ефимов и О. Г. Чахмахчева, химики-синтетики из лаборатории М. Н. Колосова. Первый продукт не заставил себя долго ждать – мы получили короткий рекомбинантный пептид лейцин-энкефалин, клонировав его генетическую структуру в *E. coli*. Совершенно естественно первым автором соответствующей статьи был идеолог этого направления в институте, Юрий Анатольевич [26].

4. НАЧАЛО ИССЛЕДОВАНИЙ СТРУКТУР РНК-ПОЛИМЕРАЗ

Где то между 1975 и 1976 Ю. А. Овчинников начал исследование структуры РНК полимеразы *E. coli*. Напомню, что в то время полагали, что этот важнейший фермент состоит из пяти субъединиц — двух α (329 аминокислотных остатков (а/к), молекулярная масса ≈ 37 кДа), β (1342 а/к и 151 кДа), β' (1407 а/к и 155 кДа), и $\sigma 70$ (613 а/к и 70 кДа). Позже к ним добавились еще субъединицы, в частности ω (90 а/к и ≈ 10 кДа), но их рассмотрение не входит в рамки данного мемориального обзора. Четыре из них – 2α , β и β' – образуют кор-фермент, ответственный за стадию элонгации транскрипции. Юрий Анатольевич начал работы с установления первичной структуры самой маленькой субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* – α . Первая публикация на эту тему появилась в 1976 г., а окончательно структура была установлена в 1977 году. И теперь предстояло устанавливать единицы большие β и β' . Эти субъединицы состоят из более чем 1300 аминокислот и это было затруднительно для метода установления аминокислотных последовательностей того времени. И Юрий Анатольевич, человек широко мыслящий и находившийся в курсе всех современных тенденций, связанных с белками, быстро понял, что к работе следует привлечь химиков, занимающихся установлением структуры нуклеиновых кислот. Это была чрезвычайно разумная идея, потому что к тому времени техника установления первичных структур нуклеиновых кислот продвинулась очень сильно, и структуру нуклеиновой кислоты можно было определить гораздо быстрее

и с меньшими затратами, чем структуру белка. А из структуры нуклеиновой кислоты можно было, пользуясь генетическим кодом, вывести структуру белка. Гены, кодирующие β - и β' субъединицы, были доступны благодаря тому, что в Институте молекулярной генетики АН СССР лаборатория замечательного генетика Романа Бениаминовича Хесина также интересовалась РНК полимеразой и к моменту начала работы группы Юрия Анатольевича уже имела клонированные в бактериофаги гены β - и β' субъединиц. Естественно, что Юрий Анатольевич привлек к работе созданную им группу биотехнологии нуклеиновых кислот. Это дало возможность нам незамедлительно начать работу по установлению структуры этих генов, и было ясно, что скоро эти структуры будут установлены. Я не буду рассказывать про эти работы. Гораздо лучше меня это сделают Валерий Михайлович Липкин и Татьяна Владимировна Овчинникова. Дам только ссылки на полные структуры этих генов и белков, опубликованные Ю. А. Овчинниковым совместно с моим коллективом [1–10].

5. ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЦЕНТРОВ РНК И ДНК-ПОЛИМЕРАЗ

Не дожидаясь конца структурной работы Юрий Анатольевич начал размышлять о функциональной структуре фермента. К этим размышлениям привлёк и меня. Я в это время тесно контактировал замечательным учёным Михаилом Александровичем Грачёвым, к сожалению, ушедшим от нас в 2022 году. Я часто ездил в командировки в Новосибирск, где в институте органической химии в отделе, возглавляемом Дмитрием Георгиевичем Кнорре, он работал. В одной из таких командировок, как это часто бывает, за обсуждением подходов, с помощью которых можно было бы определить функциональные центры РНК-полимеразы, появилась идея аффинного мечения активных центров. Идея была очень простая и она изображена на рис. 1. К этому времени в лаборатории Дмитрия Георгиевича Кнорре было установлено, что гамма анилид рибонуклеозидтрифосфатов (рис. 1, I) выступает субстратом РНК-полимераз. И если в этот субстрат ввести фоточувствительную азидную группу, как это изображено на рис. 1 (II и III),

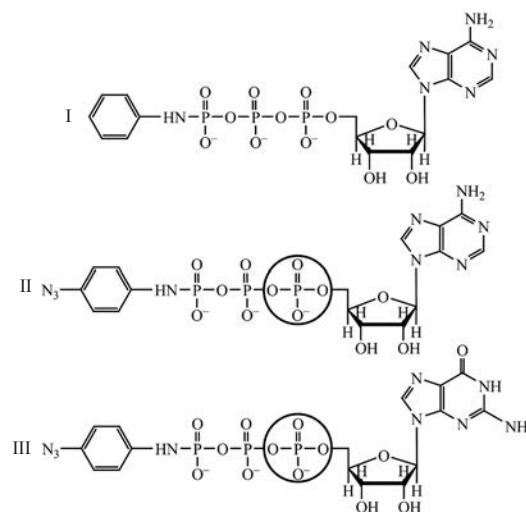


Рис 1. Субстраты РНК-полимеразы. I. γ -анилид аденозин трифосфата, II. γ -азиданилид аденозин трифосфата, III γ -азиданилид гуанозин трифосфата. Окружности обозначают α - P^{32} группу.

то можно получить реагент для фотоаффинного мечения фермента.

Мы показали, что производные аденозинтрифосфата и гуанозинтрифосфата (рис. 1), действительно являются субстратами фермента. Следовательно, эти аналоги могут быть использованы для фотоаффинного мечения РНК-полимеразы внутри транскрибирующих комплексов. Азидонилин находится на 5'-конце растущей цепи РНК. Образование новой фосфодиэфирной связи ведёт к сдвигу фотореактивной группы вдоль комплекса. Следовательно, облучение комплекса в разные моменты времени в ходе синтеза РНК создаёт возможность метить P^{32} различные сайты РНК-полимеразы в “коридоре”, вдоль которого продукт движется в транскрипционном комплексе. Мы использовали разные промотор-содержащие матрицы, представляющие собой индивидуальные фрагменты рестрикции фаговой ДНК, первичные структуры которых были известны. В качестве примера я рассмотрю фрагмент, полученный путём расщепления ДНК бактериофага Лямбда-imm434 рестриктазой EcoRI. Известно, что 5'-концевая последовательность РНК, синтезируемой РНК-полимеразой на этом фрагменте, представляет собой rppGUUGAUAGAUC. Первые четыре остатка этой последовательности состоят только из двух остатков G и U. Если в РНК-полимеразную реакцию запускать только два этих трифосфата, меченных фосфором, как

на рис. 1 и содержащих азидную группу, то синтезируется тетраолигонуклеотид, и РНК-полимераза остановится. Облучение приведет к сшивке синтезированного радиоактивного тетраолигонуклеотида с теми участками РНК-полимеразы, с которыми он контактирует. Подобным образом, давая в смесь еще аденозинтрифосфат, можно синтезировать декаолигонуклеотид. Его 5'-конец с азидной группой продвигается в другое место внутри РНК-полимеразного комплекса.

Пришивка позволит идентифицировать это место. Используя разные матрицы можно, таким образом, исследовать разные зоны РНК полимеразы, контактирующие с 5'-растущей РНК на разных этапах синтеза.

В ходе синтеза РНК субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* образуют, по-видимому, также несколько функциональных сайтов, отвечающих за связывание с 3'-ОН-концом растущей цепи РНК, с входящими нуклеозидтрифосфатами и с ДНК-матрицей. Для установления участков фермента, контактирующих с 3'-ОН-концом растущей РНК, на первых этапах синтеза мы использовали фотоаффинную модификацию субъединиц фермента синтезирующимися *in situ* олигонуклеотидами, содержащими фотореактивные 5-галогенпиримидиновые остатки вблизи 3'-ОН-конца растущей РНК.

В экспериментах σ -субъединица РНК-полимеразы специфически метится фотореактивными группами, расположенными вблизи 3'-конца синтезированного рибоолигонуклеотида. Таким образом, σ -субъединица непосредственно участвует в формировании 3'-ОН-связывающего сайта РНК-полимеразы и после диссоциации σ -субъединицы структура этого сайта меняется. В дальнейшем контактировать начинают β и β' , а контакт с σ исчезает [10]

Таким образом, был заложен фундамент для функциональных исследований функциональных центров РНК-полимеразы, а также других ферментов, полимеризующих РНК и ДНК, который в дальнейшем сильно развил, усовершенствовал и использовал М. А. Грачев и его коллеги.

6. АФГАНСКИЙ ЭПИЗОД

Три статьи с участием Ю. А. Овчинникова (из 6 статей на эту тему) посвящены Гепатиту А.

Даты этих статей совпадают со временем войны в Афганистане (1979–1989 годы). История этого эпизода отражает активную роль Ю. А. Овчинникова в жизни страны.

Где-то примерно в 1984 году мне позвонил Юрий Анатольевич и попросил зайти к нему. В его кабинете сидел генерал. Юрий Анатольевич обратился ко мне со словами: “Женя, наша армия в Афганистане просит о помощи. Вот генерал (не помню его фамилии) расскажет о проблеме”. Проблема была чудовищная. Генерал сказал, что в Афганистане войска массово выходят из строя, заболевая гепатитом А: “Там жара, – сказал он, – и солдаты пьют из любого источника, даже из луж”. Это было вечером, а утром следующего дня я обзвонил наших ведущих вирусологов – Льва Степановича Сандахчиева, тогда директора научно-производственного объединения “Вектор” в Кольцово рядом с Новосибирском, Сергея Григорьевича Дроздова, директора Института полиомиелита и вирусных энцефалитов, где тогда работал Вадим Израилевич Агол. Через три дня мы собрались и обсудили ситуацию. Сандахчиев предложил быстро создать аттенуированную вакцину против гепатита А. Для этого было нужно разработать методы культивации этого вируса, его аттенуации и культивирования. Это было самое быстрое, что можно было сделать. Что же касается Института полиомиелита, то мы с медицинским академиком Дроздовым и Вадимом Израевичем Аголом решили идти по пути использования готовой вакцины против полиомиелита, заменив в нём гены, кодирующие антигенные детерминанты, на соответствующие гены из вируса гепатита А. Это была очень рискованная работа, потому что было неясно, будут ли эти замены в геноме полиомиелита совместимы с его жизнеспособностью. Работы начались незамедлительно, и к 1988 году была готова технология производства аттенуированной вакцины у Сандахчиева, а в 1989 году мы показали, что вирус полиомиелита с заменами антигенов на антигены вируса гепатита А жизнеспособен. Мы задание выполнили, но в это время война в Афганистане закончилась, в нашей стране началась неразбериха, и вакцины оказались никому не нужны, но работы по ним были изящными, оригинальными и были соответствующим образом опубликованы.

7. НОВОЕ ЗДАНИЕ ИБХ НА УЛИЦЕ МИКЛУХО-МАКЛЯЯ. ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЙ БЛОК

Генная инженерия, как отрасль молекулярной биологии, берет начало с 1972 года в Стэнфордском университете, в США. Тогда, как я уже упоминал, лаборатория Пола Берга, получила вне организма рекомбинантную (гибридную) молекулу ДНК, состоящую из фрагментов фаговой, бактериальной и вирусной ДНК. Следующим революционным шагом стала статья Стенли Козна и Герберта Бойера (1973) об успешном переносе человеческого гена инсулина в клетку *Escherichia coli* и осуществлении его экспрессии. Сразу же в индивидуальном порядке они объявили мораторий на свои исследования и призвали к этому своих коллег. В 1975 году Пол Берг и другие “генные инженеры” организовали Асиломарскую конференцию по рекомбинантной ДНК, на которой были обсуждены возможные риски, связанные с созданием генетически модифицированных организмов (ГМО), и в 1976 г. была разработана система правил, регламентировавшая подобные исследования. В этом же году Овчинников начал строить новое здание Института, сверху напоминающее двойную спираль ДНК. Естественно, в нем было предусмотрено помещение для генной инженерии, причем в самом опасном варианте, так называемом Р4. Создавать его проект совместно с югославской фирмой, которую подрядили строить институт, Юрий Анатольевич поручил мне. Фирма до этого строила только жилые дома и гостиницы и, естественно, не имела представления об оборудовании и планировке помещений для безопасной работы с рекомбинантными ДНК. Я отверг первый же их проект и дал рекомендации по требованиям, предъявляемым к таким помещениям. Однако, второй вариант также был непригоден. Я изложил ситуацию Ю. А. Овчинникову и предложи пригласить квалифицированных консультантов.

В это время я поехал в командировку в Англию и там меня пригласили в Институт микробиологии в Солсбери (надеюсь помню правильно, много времени прошло), который до этого был закрытым военизированным учреждением, но в связи с разрядкой его открыли и перевели на самофинансирование. Они предложили услуги по проектированию помещений для работы с

особо опасными микроорганизмами. Я ознакомился с их помещениями и сотрудниками, руководившими подобного рода работами, рассказал им о своих проблемах, и они предложили создать для нашего Института соответствующий проект. Приехав в Москву, я пошёл к Юрию Анатольевичу, изложил ему ситуацию и предложил пригласить людей из этого института для создания нашего проекта. Юрий Анатольевич сначала отверг это предложение, поскольку это стоило довольно больших денег, причём валютных. Однако, вскоре деньги для приглашения проектантов из Солсбери были найдены, был составлен проект и согласован с ГИПРОНИИ Академии наук. В результате появилось то помещение, которое сейчас существует, но оно уже потеряло свою функциональность. Сразу после того, как помещение было построено и принято приёмной комиссией, я попросил Юрия Анатольевича назначить ответственного за это помещение. Юрий Анатольевич назначил Юру Ушкарёва, который до этого долго работал в моей лаборатории над проектом первичной структуры РНК-полимеразы. что касается нового здания, то оно служит великолепным памятником Юрию Анатольевичу. Работать в нем комфортно и почетно.

Кто-то из великих сказал: “нужно быть абсолютно выдающимся, чтобы тебя помнили через 10 лет после твоей смерти”.

Мы, наши ученики будем помнить академика Овчинникова Юрия Анатольевич всегда.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lipkin V.M., Sverdlov E.D., Monastyrskaya G.S., Ovchinnikov Yu.A. // Method. Protein Sequence Anal. 1982. P. 355–362.
2. Lipkin V.M., Sverdlov E.D., Ovchinnikov Yu.A. // Proc. Indian Natn. Sci. Acad. 1982. P. 56–68.
3. Marchenko T.V., Lipkin V.M., Chertov Yu.O., Sverdlov E.D., Ovchinnikov Yu.A. // Int. J. Quantum Chem. 1981. V. 20. P. 283–289.
<https://doi.org/10.1002/qua.560200202>

4. Ovchinnikov Yu.A., Monastyrskaya G.S., Gubanov V.V., Guriev S.O., Chertov O.Yu., Modianov N.N., Grinkevich V.A., Makarova I.A., Marchenko T.V., Polovnikova I.N. // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1980. V. 253. P. 994–998.
5. Ovchinnikov Yu.A., Monastyrskaya G.S., Gubanov V.V., Guriev S.O., Salomatina I.S., Shuvaeva T.M., Lipkin V.M., Sverdlov E.D., Shemakina M.M. // Dokl. Ros. Akad. Nauk. 1981. V. 261. P. 763–768.
6. Ovchinnikov Yu.A., Monastyrskaya G.S., Gubanov V.V., Gureyev S.O., Chertov O.Y., Modyanov N.N., Grinkevich V.A., Makarova I.A., Marchenko T.V., Polovnikova I.N. // Europ. J. Biochem. 1981. V. 116. P. 621–629.
7. Ovchinnikov Yu.A., Monastyrskaya G.S., Gubanov V.V., Salomatina I.S., Shuvaeva T.M., Lipkin V.M., Sverdlov E.D. // Rus. J. Bioorg. Chem. 1981. V. 7. P. 1107–1112.
8. Ovchinnikov Yu.A., Monastyrskaya G.S., Guriev S.O., Kalinina N.F., Sverdlov E.D., Gragerov A.I., Bass I.A., Kiver I.F., Moiseyeva E.P., Igumnov V.N., Mindlin S.Z., Nikiforov V.G., Khesin R.B. // Mol. Gen. Genet. 1983. V. 190. P. 344–348.
<https://doi.org/10.1007/bf00330662>
9. Овчинников Ю.А., Сverdlov E.D., Липкин В.М., Монастырская Г.С., Чертов О.Ю., Губанов В.В., Гурьев С.О., Модянов Н.Н., Гринкевич В.А., Макарова И.А., Марченко Т.В., Половникова И.Н. // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. С. 655–665.
10. Sverdlov E.D., Tsarev S.A., Levitan, T.L., Lipkin, V.M., Modyanov, N.N., Grachev, M.A., Saychikov, E.F., Pletnev, A.G., Ovchinnikov, Yu.A. / Interaction of E. coli RNA Polymerase with Substrates During Initiation of RNA Synthesis at Different Promoters in Macromolecules in the Functioning Cell / Salvatore F., Marino G., Volpe P., Eds., Springer, Boston M.A., 1979, Plenum Press, New York.
https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3465-1_10
11. Broude N.E., Sverdlov E.D., Ovchinnikov Yu.A. The Family of Human Na⁺, K⁺-ATPase Genes, Organization and Function of the Eucaryotic Genome / Abstracts Seventh German-Soviet Symposium, 1987, April 2–4, Springer, Heidelberg.
12. Ovchinnikov Yu.A., Monastyrskaya G.S., Broude N.E., Ushkarev Yu.A., Dolganov G.M. // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1986. V. 287. P. 1251–1254.
13. Ovchinnikov Yu.A., Modyanov N.N., Broude N.E., Petrukhin K.E., Grishin A.V., Arzamazova N.M., Aldanova N.A., Monastyrskaya G.S., Sverdlov E.D. // FEBS Lett. 1986. V. 201. P. 237–245.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80616-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80616-0)
14. Ovchinnikov Yu.A., Monastyrskaya G.S., Broude N.E., Allikmets R.L., Ushkaryov Yu.A., Melkov A.M., Smirnov Yu.V., Malyshev I.V., Dulubova I.E., Petrukhin K.E. // FEBS Lett. 1987. V. 213. P. 73–80.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)81467-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)81467-9)
15. Ovchinnikov Yu.A., Monastyrskaya G.S., Broude N.E., Ushkaryov Yu.A., Melkov A.M., Smirnov Yu.V., Malyshev I.V., Allikmets R.L., Kostina M.B., Dulubova I.E. // FEBS Lett. 1988. V. 233. P. 87–94.
16. Sverdlov E.D., Tsaryov S.A., Modyanov N.N., Lipkin V.M., Grachev M.A., Zaychikov E.F., Pletnyov A.G. // Bioorg. Khim.(USSR). 1978. V. 4. P. 1278.
17. Sverdlov E.D., Tsarev S.A., Kuznetsova N.F. // FEBS Lett. 1980. V. 112. P. 296–298.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(80\)80202-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(80)80202-X)
18. Ovchinnikov Yu.A., Sverdlov E.D., Monastyrskaya G.S., Tsarev S.A., Zaitseva E.M. // Mol. Biol. 1984. V. 18. P. 48–59.
19. Ovchinnikov Yu.A., Sverdlov E.D., Tsarev S.A., Khodkova E.M., Monastyrskaya G.S. // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1982. V. 262. P. 725–728.
20. Ovchinnikov Yu.A., Sverdlov E.D., Tsarev S.A., Monastyrskaya G.S., Khodkova E.M. // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1983. V. 268. P. 996–1000. PMID: 6187523
21. Ovchinnikov Yu.A., Sverdlov E.D., Tsarev S.A. // Electronic J. Inform. Technol. Construct. 1982. V. 1–6. P. 265.
22. Ovchinnikov Yu.A., Sverdlov E.D., Tsarev S.A. // Electronic J. Inform. Technol. Construct. 1982. V. 1–6. P. 262.
23. Ovchinnikov, Yu.A., Zhdanov V.M., Khodkova E.M., Efimov V.A., Chakhmakheva D.G., Kustetsov V.P. // Labor-Med. (GIT-Verlag Giebeler). 1983. V. 6. P. 385–392.
24. Sverdlov E.D., Monastyrskaya G.S., Budowsky E.I., Grachev M.A. // FEBS Lett. 1972. V. 28. P. 231–235.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(72\)80719-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(72)80719-1)
25. Sverdlov E.D., Monastyrskaya G.S., Chestukhin A.V., Budowsky E.I. // FEBS Lett. 1973. V. 33. P. 15–17.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80148-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80148-6)
26. Ovchinnikov Yu.A., Dolganov G.M., Efimov V.A., Monastyrskaya G.S., Sverdlov E.D. // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1979. V. 248. P. 1486–1491.
27. Balayan M.S., Kusov Yu.Yu., Andjaparidze A.G., Tsarev S.A., Sverdlov E.D., Chizhikov V.E., Blinov V.M., Vasilenko S.K. // FEBS Lett. 1989. V. 247. P. 425–428.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81384-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81384-5)
28. Kusov I.I., Kazachkov I.A., Grabko V.I., Nastashenko T.A., Balayan M.S., Tsarev S.A., Rokhlina T.O., Sverdlov E.D. // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1987. V. 294. P. 731–734
29. Sverdlov E.D., Tsarev S.A., Markova S.V., Rostapshov V.M., Azhikina T.L., Chenov I.P., Gorbalenya A.E., Kolesnikova M.S., Romanova L.I., Teterina N.L. // FEBS Lett. 1989. V. 257. P. 354–356.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81570-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81570-4)
30. Ovchinnikov Yu.A., Sverdlov E.D., Tsarev S.A., Arsenian S.G., Rokhlina T.O. // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1985. V. 285. P. 1014–1018. PMID: 3000718
31. Шемякин, М. М., Арбузов, Ю. А., Колосов, М. Н., Овчинников, Ю. А. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 133. С. 1121–1124.

Yuri Anatolyevich Ovchinnikov and I. The Big is Seen from a Distance

© 2024 E. D. Sverdlov*,#

E-mail: edsverd@gmail.com

* National Research Center "Kurchatov Institute", pl. Acad. Kurchatova 1, Moscow, 123182 Russia

I have talked about Yuri Anatolyevich in many popular articles. We have more than 30 publications in common. In particular, more than 10 are on RNA polymerase; 5 are on ATPase, 1 (out of 3) is devoted to photoaffinity modification of the active centers of RNA polymerase; 18 articles and patents on interferons, 10 of which involve Yuri Anatolyevich: 6 of the most significant, 7 articles and patents (3 of which involve Yuri Anatolyevich) are devoted to the problem of a vaccine against the Hepatitis A virus.

I was part of the team that received the USSR State Prize in 1981 for work on RNA polymerase, headed by Yuri Anatolyevich. It should also be noted that with the active assistance of Yu. A. Ovchinnikov, industrial production of interferon was organized, which I called Reaferon (recombinant alpha interferon), and I, together with other participants in this difficult work, was awarded the Lenin Prize. Reaferon is sold in pharmacies to this day and will be used for a very long time. I have provided this data so that it is clear how close our cooperation was.

Keywords: bioorganic chemistry



УДК 577.114

МЕТОДЫ ВВЕДЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МЕТКИ В ПОЛИСАХАРИДЫ

© 2024 г. А. Ю. Нокель*, **, Н. В. Бовин*, #, А. Б. Тузиков*,
Т. В. Овчинникова*, Н. В. Шилова*, **

* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** ФГБУ “Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова”
Минздрава России,
Россия, 117997 Москва, ул. Опарина, 4

Поступила в редакцию 30.11.2023 г.

После доработки 08.12.2023 г.

Принята к публикации 09.12.2023 г.

Полисахариды широко представлены у растений и бактерий, отличаются необычайным структурным разнообразием и выполнением разнообразных функций. Для изучения функций полисахаридов необходимы их меченые производные. В представленном обзоре рассмотрены подходы для введения флуоресцентных меток в полисахариды путем химической модификации тех или иных функциональных групп этих сложных биополимеров, а также с помощью так называемых биоортогональных реакций, позволяющих проводить мечение в клетке, не влияя на ее жизнеспособность. Кроме модификации органическими красителями обсуждена также возможность применения координационных соединений лантаноидов и квантовых точек.

Ключевые слова: полисахариды, флуоресцентная метка, лантаноиды, химическая модификация, биоортогональные реакции

DOI: 10.31857/S0132342324040026, **EDN:** MXJCQY

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	360
2. ФЛУОРОФОРЫ	360
2.1. Органические флуорофору	360
2.2. Комплексы лантаноидов	361
2.3. Квантовые точки	361
2.4. Флуоресцентные белки	362
3. МЕТОДЫ ВВЕДЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ФЛУОРОФОРОВ	362
3.1. Введение по восстанавливающему концу ПС	362
3.2. Модификации по гидроксильным группам полисахаридов	364
3.3. Модификации по преобладающим аминогруппам полисахаридов	365
3.4. Модификация полисахаридов, содержащих карбоксильные группы	366
3.5. Использование методов клик-химии	367
4. МЕТОДЫ ВВЕДЕНИЯ ФЛУОРОФОРОВ НА ОСНОВЕ ЛАНТАНОИДОВ	370

Сокращения: КТ – квантовые точки; ЛПС – липополисахариды; ПС – полисахариды.

Автор для связи: (тел.: +7 (916) 474-93-82; эл. почта: professorbovin@yandex.ru).

5. МЕТОДЫ ВВЕДЕНИЯ ФЛУОРОФОРОВ НА ОСНОВЕ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК	371
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	372
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	373

1. ВВЕДЕНИЕ

Полисахариды (ПС) в живой природе выполняют важные биологические функции: структурную, защитную, резервную. В растительной клетке ПС и полисахаридные комплексы служат основным конструкционным материалом, определяющим изменения формы клетки и всего растения в целом, а также реализуют десятки других функций [1]. В мире бактерий ПС в виде липополисахаридов (ЛПС) и капсульных полисахаридов защищают бактериальную клетку не только от неблагоприятных внешних физических воздействий, но и от иммунного ответа организма-хозяина. ЛПС инфекционных бактерий, образующиеся в результате разрушения бактериальных клеток иммунной системой человека, действуют как ее мощнейшие дисрегуляторы [2, 3]. Микробиом кишечника выполняет ключевую функцию в формировании репертуара естественных антител, и ПС в этом процессе играют существенную, а возможно, даже главную роль [4, 5]. Изучение перечисленных функций самих ПС, а также ПС-связывающих белков растительной, бактериальной и животной клеток невозможно без использования меченых ПС, в первую очередь, флуоресцентно-меченых. Метка дает возможность проследить локализацию и метаболизм ПС, а также их взаимодействие с белками; в последнем случае меченые ПС выступают в качестве инструментов исследования, в частности при поиске клеточных рецепторов [6]. Полисахариды весьма разнообразны с химической точки зрения, что, с одной стороны, осложняет их модификацию, а с другой – дает некоторую гибкость при ковалентном мечении.

Цель данного обзора – проанализировать, какие флуорофоры используются для мечения, какие способы введения метки используются и какие оптимальны для определенных видов ПС, а также какие из флуорофоров лучше всего соответствуют решению перечисленных выше задач гликобиологии, биологии растительной клетки и микробиологии.

Методы введения флуорофора рассматриваются в обзоре в соответствии с природой функциональных групп ПС:

- присоединение по альдегидной группе восстанавливающих ПС;
- реакции с гидроксильными группами ПС;
- реакции с ПС, содержащими аминогруппы;
- реакции с ПС, содержащими карбоксильные группы.

Кроме того, отдельно рассмотрены методы клик-химии, а также лантаноиды и нанокристаллы (квантовые точки).

2. ФЛУОРОФОРЫ

Флуорофор – это фрагмент молекулы, придающий ей флуоресцентные свойства. Флуоресценция – разновидность люминесценции, которая представляет собой нетепловое испускание света, происходящее при возвращении электрона с возбужденного состояния (S_1) на более низкую орбиталь (S_0). Типичное время жизни возбужденного состояния составляет 10^{-9} – 10^{-7} с [7].

Существует большое разнообразие флуоресцирующих соединений с различными фотофизическими свойствами. В основном это органические красители, координационные соединения лантаноидов, флуоресцентные белки и наночастицы. Каждый класс имеет свои специфические особенности, преимущества и недостатки. Рассмотрим их по порядку.

2.1. Органические флуорофоры

Многие органические вещества, содержащие, как правило, систему сопряженных π -связей, способны к флуоресценции. В 1871 г. Адольф Байер сообщил о синтезе интенсивно флуоресцирующего красителя, названного флуоресцином. С тех пор этот краситель и его производные относятся к числу наиболее широко применяемых в самых различных областях химии и смежных наук. Другие не менее известные флуо-

ресцирующие органические молекулы – метиновые красители (наиболее известные из них – это цианиновые Cy3 , Cy5 и т.д.), флуорофоры кумаринового, ксантенового семейств (наиболее известны их модифицированные версии – AlexaFluor™), а также родамины, Люцифер желтый, Нильский красный и многие другие, но только малая их часть стала использоваться в качестве меток для макромолекул по ряду причин, среди которых – способность этих молекул к химической модификации, стабильность при проведении опыта, удобные для измерения параметры возбуждения/эмиссии, минимальное взаимодействие с исследуемыми объектами, возможность сочетать различные флуорофоры в одном эксперименте. Также важны размер, заряд молекулы, растворимость и т.д. Последняя часто определяет выбор флуорофора для мечения полисахаридов, поскольку многие из них не растворимы в органических растворителях.

2.2. Комплексы лантаноидов

Люминесценцией обладают трехвалентные ионы лантаноидов. Электронно возбужденный Gd^{3+} излучает в УФ-области; Pr^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} и Tm^{3+} – в видимой области; Nd^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} и Yb^{3+} – в инфракрасной области. Однако добиться эффективного фотовозбуждения ионов лантаноидов из-за запрещенных 4f-4f-переходов по правилу Лапорта довольно сложно, что приводит к низким коэффициентам экстинкции [8]. Поэтому увеличения интенсивности флуоресценции добиваются с помощью комплексообразования с органическими лигандами. Эмиссия таких комплексов может быть осуществлена благодаря возбуждению электронных уровней в самом лиганде, после чего энергия собирается на возбужденных состояниях ионов металла благодаря интрамолекулярной передаче. Это явление получило название “антенный эффект” [9]. Люминесценцию лантаноидных комплексов стабилизируют алифатическими и ароматическими β -дикетонами [8], а также в сочетании с *N*-гетероциклическими хромофорами, такими как пиридин, бипиридин, терпиридин, фенантролин и бензимидазол.

Продолжительное время жизни возбужденного состояния таких координационных соединений позволяет исключить сигналы других флуоро-

форов путем введения временной задержки (10–200 мкс) между временем возбуждения и измерения флуоресценции, что делает возможным их использование в методе TR-FRET (перенос энергии флуоресценции с временным разрешением) для визуализации процесса внутриклеточного лиганд-рецепторного, субстрат-ферментного и других взаимодействий. При этом антенны, используемые с лантаноидами, имеют поглощение, как правило, в диапазоне длин волн 320–400 нм, а излучение комплексов с лантаноидами находится в диапазоне 500–1500 нм.

2.3. Квантовые точки

Флуоресцентными свойствами обладают полупроводниковые наночастицы или квантовые точки (КТ). Существует два вида КТ, которые разделяют по методу получения: коллоидные и эпитаксиальные. Первые представляют собой фрагмент проводника или полупроводника с размерами 2–10 нм, вторые – с размерами 10–150 нм [10]. В биологических исследованиях используют, как правило, коллоидные КТ.

Неорганические квантовые точки состоят из ядра (например, CdSe , CdTe , CdS , ZnSe , InP , InAs) и защитной оболочки, в качестве которой используют, например, ZnS , CdS и ZnSe . Наиболее хорошо изучены КТ на основе кадмия (CdSe , CdTe) [11, 12]. Известны КТ на основе оксида цинка [12] и халькогенидов серебра (сульфид, селенид, теллурид) [13]. Для биологических исследований последние имеют особое значение, т.к. имеют флуоресценцию в ближней инфракрасной области (600–1200 нм). В этой области живые ткани почти прозрачны. К перспективным кандидатам можно отнести фосфид индия, антимонид индия, арсенид индия и арсенид галлия [14].

Основное преимущество КТ заключается в возможности высокоточного контроля над ее размером, а следовательно, и над проводимостью, что позволяет создавать флуорофоры разных цветов из одного и того же материала по одной методике. Они обладают отличными от органических флуорофоров оптическими характеристиками [15, 16], которые определяют возрастающий интерес к ним, а именно:

– узким симметричным пиком флуоресценции (в отличие от органических красителей);

– широкой полосой возбуждения, что позволяет возбуждать нанокристаллы разных цветов одним источником излучения;

– высокой фотостабильностью, что позволяет использовать источники возбуждения высокой мощности.

Неорганические КТ разрушаются в водной среде, поэтому им требуется защитная оболочка, кроме того, для биологических исследований они должны быть нетоксичны и растворимы в воде, поэтому их дополнительно обрабатывают поверхностно активными соединениями – алкоксисиланами, фосфолипидами, карбоксиметил- β -циклодекстрином, хитозаном, олеиновой кислотой, меркаптоуксусной кислотой и др. [12].

Альтернативой неорганическим КТ могут служить углеродные точки благодаря их лучшей биосовместимости. Их случайно обнаружили в 2004 г. в результате электрофоретического анализа углеродных нанотрубок, полученных из сажи [17]. Название “углеродные квантовые точки” по отношению к флуоресцентным углеродным наночастицам было введено в употребление в 2006 г., т.к. они имели такой же размер, как и неорганические КТ (<10 нм) [18], и обладали сравнимыми с классическими квантовыми точками оптическими свойствами. Они обладают высокой стабильностью и проводимостью, низкой токсичностью, экологичностью. Их получают разрушением более крупных углеродных структур (графит, углеродные нанотрубки, сажа) [17, 19] либо синтезом из низкомолекулярных веществ (глюкозы, этанола [20, 21], бензохинона и триэтилентетрамина [22]). В литературе редко приводят реальные структуры углеродных КТ. Упоминают только, что они бывают графеноподобными или содержат так называемый аморфный углерод [23]. Механизмы, ответственные за способность углеродных точек к флуоресценции, активно обсуждаются. Высказано предположение, что излучение углеродных точек происходит в результате радиационной рекомбинации самозахваченных экситонов (связанное состояние из электрона и электронной дырки) [24].

2.4. Флуоресцентные белки

Родоначальник этой разновидности флуорофоров – зеленый флуоресцентный белок (GFP) из медузы *Aequorea victoria*. За его открытие и

изучение в 2008 г. Осаме Симомуре, Мартину Чалфи и Роджеру Тсьен была присуждена Нобелевская премия. В результате замены отдельных аминокислот из окружения флуорофора были получены белки с другими цветами флуоресценции [25]. Флуоресцентные белки – прекрасные маркеры для визуализации живых клеток и организмов, однако из-за большого размера для мечения других молекул, в частности полисахаридов, они не используются.

3. МЕТОДЫ ВВЕДЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ФЛУОРОФОРОВ

3.1. Введение по восстанавливающему концу ПС

Полисахарид с восстанавливающим концом – это ПС, у которого хотя бы один полуацетальный гидроксил остается свободным и реакционно-способным. Далеко не все нативные ПС имеют восстанавливающий конец, кроме того, альдегидная функция может оказаться утерянной в процессе выделения (например, на стадии восстановления боргидридом). И наоборот, значительная часть (если не подавляющая) ПС приобретает альдегидную (иногда кетонную, если концевой моносахарид относится к кетозам) группу в результате химических манипуляций по выделению из сложноорганизованных биобъектов, таких как клеточная стенка (например, при обработке гликозилгидролазами [26]).

На рис. 1 приведены варианты присоединения флуорофоров по альдегидной группе.

Взаимодействие с аминами. Наиболее популярный способ модификации по восстанавливающему концу ПС – метод восстановительного аминирования, основанный на образовании основания Шиффа в результате взаимодействия альдегидной группы сахара с аминогруппой флуорофора (рис. 1б). Эти реакции, как правило, проводят в водно-органической среде (вода, метанол) с добавлением уксусной кислоты. Реакции идут при нагревании в диапазоне температур 37–80°C.

В большинстве случаев для восстановления основания Шиффа используется цианборгидрид натрия [27–31]. Поскольку этот реагент в ходе реакции выделяет синильную кислоту, в качестве альтернативы предлагается использовать пири-

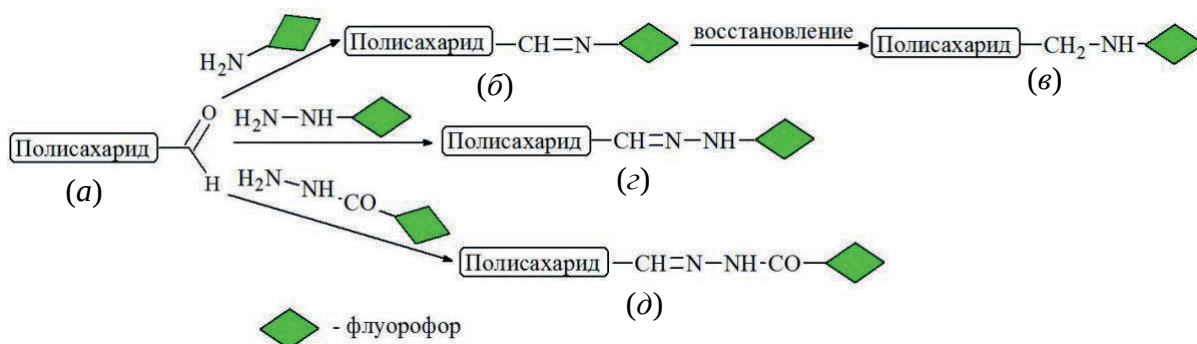


Рис. 1. Введение флуоресцентной метки по альдегидной группе (здесь и далее зеленый ромб – это флуоресцентная метка): восстанавливающий полисахарид (а), основание Шиффа (б), восстановленное основание Шиффа (в), гидразон – продукт реакции с гидразином (г), гидразон – продукт реакции с гидразидом (д).

динборан [32] и пиколинборан [33–35]. Первый обладает высокой восстанавливающей активностью, но разлагается уже при 54°C и имеет срок хранения 6 месяцев. Более устойчивы пиколинборан и 5-этил-2-метилпиридинборан, однако необходимо учитывать, что последний нерастворим в воде [36]. Следует также предварительно проверять устойчивость самого флуорофора к действию восстановителя.

В некоторых случаях восстанавливающий конец с помощью восстановительного аминирования можно трансформировать в гликозиламин присоединением аммиака или диамина [37]. Образующуюся аминогруппу далее ацилируют флуорофором, например, в виде сульфохлорида [38].

При введении алифатического диамина не исключено перекрестное сшивание полисахаридных молекул. Во избежание подобных проблем используют аминоэтиланилиновый мостик [39, 40],

в котором с сахаридом избирательно реагирует ароматический амин, а алифатический остается свободным.

Чтобы сохранить восстанавливающий моносахарид в циклическом виде (который теряется при любом варианте восстановительного аминирования), существует вариант превращения 1-OH в 1-NH₂-группу действием водного раствора гидрокарбоната аммония [41, 42] или карбамата аммония [42–45] с последующим двухстадийным превращением в глицильное производное [46–48], которое ацилируется флуорофором. Для этой же цели предложен еще один метод введения мостика с аминогруппой реакцией 2-(метиламиноокси)-этанамина с восстанавливающим концом сахара (рис. 2) [49]. По полученной аминогруппе можно присоединять флуорофор. Однако такие превращения для полисахаридов пока не использовались.

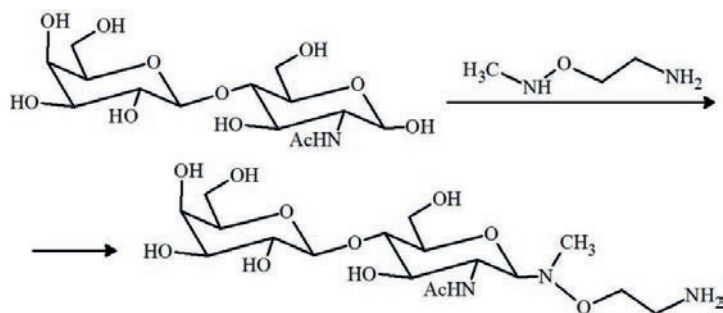


Рис. 2. Введение аминогруппы с помощью производного гидроксиламина на примере дисахарида *N*-ацетиллактозамина.

Взаимодействие с гидразинами и гидразидами. Мечение ПС гидразинами и гидразидами флуорофоров (рис. 1) проходит в одну стадию. Реакции проводят, как правило, в водно-спиртовой среде с добавлением уксусной кислоты [50]. Образующиеся по этой реакции гидразоны – более стабильные соединения, чем основания Шиффа, однако могут обратимо переходить в циклическую форму [51, 52]. Во избежание протекания обратной реакции в процессе применения меченого полисахарида их, как и основания Шиффа, восстанавливают [53, 54].

Наряду с гидразинами и гидразидами предлагают тиосемикарбазид флуоресцеина для мечения полисахаридов [55].

3.2. Модификации по гидроксильным группам полисахаридов

Далеко не все полисахариды являются восстанавливающими, поэтому модификации подвергают и другие функциональные группы, в част-

ности гидроксилы. Гидроксильные группы в ПС различаются по реакционной способности. Наиболее доступны для объемных заместителей (а флуорофоры – обычно объемные молекулы) первичные гидроксильные группы; доступность (а потому и реакционная способность) вторичных гидроксидов значительно различается. Так, гидроксильные группы в экваториальном положении обладают большей реакционной способностью, чем те, которые находятся в аксиальном положении. В ПС оказывают влияние на реакционную способность и внутримолекулярные водородные связи. Гидроксильные группы, которые выступают в качестве доноров в водородных связях, могут проявлять повышенную нуклеофильность [56].

На рис. 3 приведены варианты присоединения флуорофора по гидроксильной группе.

Взаимодействие с цианатами. Для мечения полисахаридов применяют изоцианаты и изотиоцианаты (рис. 3, реакции *a* и *b*) [57]. Их начали

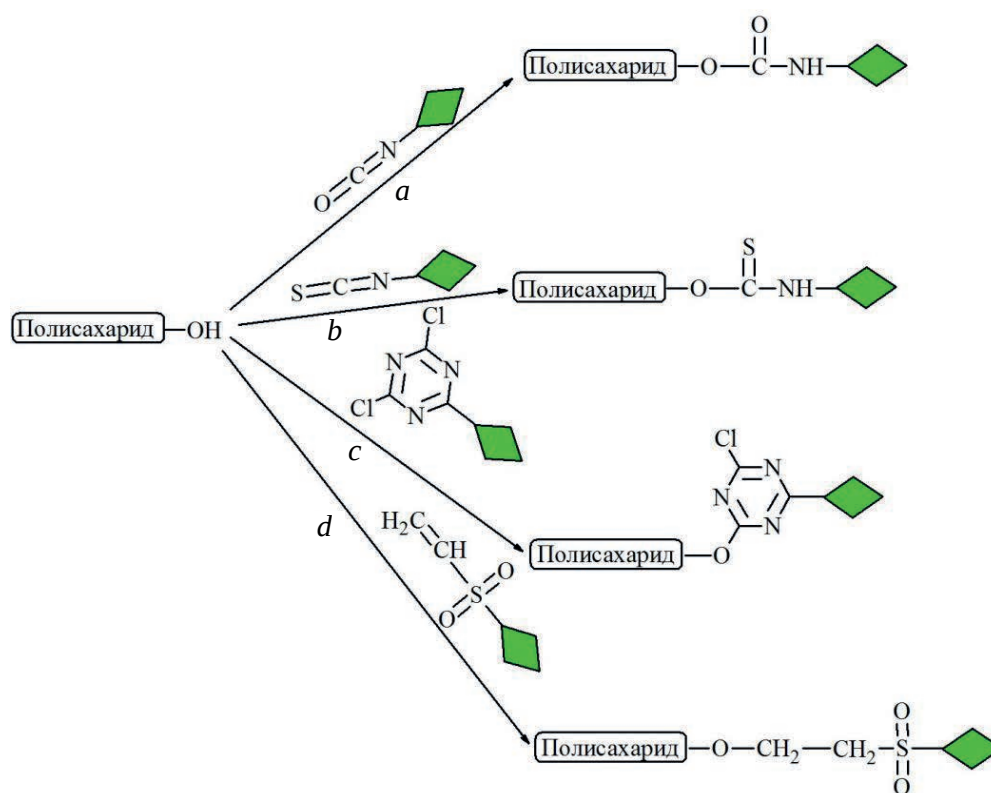


Рис. 3. Введение флуоресцентной метки по гидроксильной группе: реакция с изоцианатами (*a*), изотиоцианатами (*b*), дихлордизазином (*c*) и винилсульфоном (*d*).

использовать для введения функциональных групп по гидроксилам полисахаридов с 1940-х гг.

Модификацию полисахаридов осуществляют с помощью диизоцианатов, например, 2,4-толуолдиизоцианатом, *n*-фенилендиизоцианатом, 4,4'-дифенилметандиизоцианатом или гексаметилендиизоцианатом [58] с последующим присоединением диамина в стехиометрическом избытке [59]; полученное аминокпроизводное полисахарида можно использовать для введения флуоресцентной метки (см. ниже подраздел “Модификации по предсуществующим аминокгруппам полисахаридов”). Недостаток изоцианатов – их малая стабильность при хранении, они гидролизуются водой. В связи с этим лучше использовать изотиоцианаты, которые меньше подвержены гидролизу и менее токсичны [60, 61]. Обычно ПС по гидроксилам метят в слабощелочной среде (рН 8.5) при комнатной температуре [62].

Взаимодействие с триазиновым производным флуорофора. Триазиновые производные флуорофоров реагируют с гидроксильными полисахаридами в мягких условиях (при комнатной температуре) в водной среде при значении рН 8–10 (рис. 3, реакция *c*) [60].

Показано, что при рН ~ 8 целлюлоза взаимодействует только с одним из двух активных атомов хлора в молекуле дихлортриазинового красителя уже при комнатной температуре [63]. Основное преимущество триазинового производного флуорофора (обычно используется 5-(4,6-дихлордизаинил)аминофлуоресцеин, DTAF), в отличие от многих других органических флуоресцентных меток, состоит в том, что можно проводить реакцию с ПС в водных растворах.

Взаимодействие с флуорофором, активированным винилсульфоновой группой. В основе этого процесса лежит реакция Михаэля, заключающаяся в нуклеофильном присоединении по кратной углерод-углеродной связи, сопряженной с электроноакцепторной группой (рис. 3, реакция *d*). Так, например, винилсульфоновые красители (они могут быть флуоресцентными), содержащие сульфоновые или карбоксильные заместители (для растворимости в воде), вводят в молекулу целлюлозы в водно-щелочном растворе [64].

Красители с винилсульфоновой группой обладают стабильностью в воде и органических растворителях при комнатной температуре. Этот метод

мечения предлагается использовать для различных биомолекул [65]. Эту же реакцию успешно применяют при иммобилизации ПС на поверхности кремниевых пластин, модифицированных винилсульфовыми группами. Реакция проходит при рН 7.5–10.0 при комнатной температуре за 16 ч [66].

3.3. Модификации по предсуществующим аминокгруппам полисахаридов

Аминокгруппа, как правило, есть в составе ЛПС и в некоторых случаях – бактериальных капсульных полисахаридов [6, 67–72]. Из ЛПС полисахарид получают путем мягкого кислотного гидролиза, в результате чего в его составе остается аминокгруппа фосфоэтаноламинового остатка. Если в ПС нет аминокгруппы (как, например, в растительных ПС) – ее можно ввести (см. выше в п. “Взаимодействие с аминами”).

На рис. 4 приведены варианты присоединения флуорофора по аминокгруппе.

Взаимодействие с сукцинимидным эфиром флуорофора. *N*-Гидроксисукцинимидный эфир реагирует с аминокгруппой ПС с образованием амида карбоновой кислоты (рис. 4, реакция *a*).

Таким методом получают, например, конъюгаты частично гидролизованного хитозана (с молекулярной массой ~5 кДа) и ультрафиолетового флуорофора ZW800-1 [73]. Эта метка вводится в фосфатном буфере (рН 8) при комнатной температуре в течение 6 ч.

С помощью сукцинимидного эфира метки BODIPY проводят мечение ПС, содержащих фосфоэтаноламин, в микромасштабе (до 0.1 мг ПС). Разработанная методика позволяет создать библиотеку флуоресцентных полисахаридных зондов для изучения их взаимодействия с дендритными клетками человека с помощью цитофлуориметрии [6].

Взаимодействие с производными сульфохлорида. Сульфохлориды (хлорангидриды сульфокислот) реагируют с аминами (рис. 4, реакция *b*) и спиртами, но в последнем случае необходимо добавлять основание (реакция проводится, как правило, в органической среде).

Флуоресцентные метки с помощью сульфохлоридов вводятся в основном в пептиды. В углеводной химии этим методом пользуются редко, по-

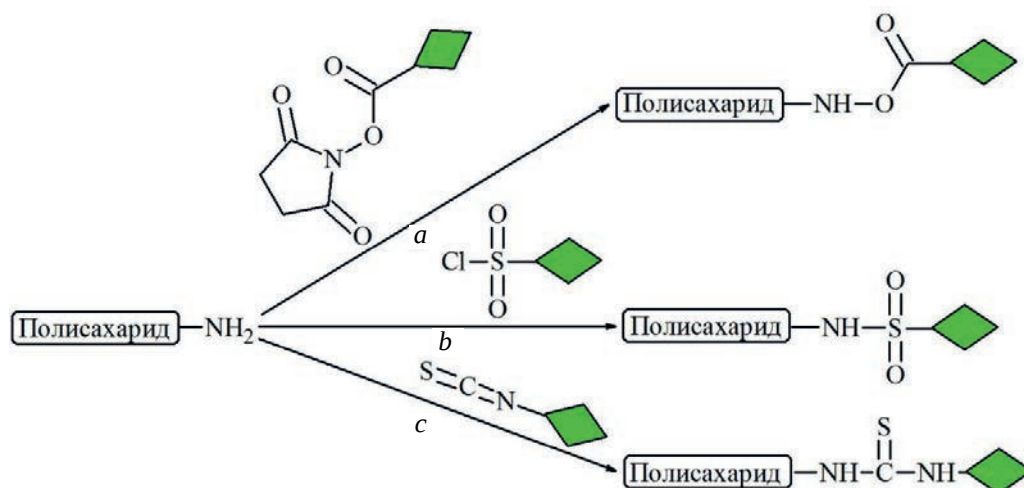


Рис. 4. Введение флуоресцентной метки по аминогруппе: реакция с сукцинимидным эфиром (a), сульфохлоридом (b) и изотиоцианатом (c).

видимому, из-за лабильности сульфохлоридов в водной среде. Тем не менее примеры таких работ есть – в частности, было получено дансильное производное α -(1 $\rightarrow$ 6)-олигоманнана реакцией дансилхлорида с олигосахаридом, содержащим защищенные гидроксильные группы и аминогруппу, в смеси *N*-метилимидзола и безводного хлористого метилена [74].

Взаимодействие с изотиоцианатами. Изотиоцианатные производные флуорофоров могут быть использованы как для мечения по гидроксильной группе (как описано выше в п. “Взаимодействие с цианатами”), так и по аминогруппе полисахаридов (рис. 4, реакция c). С аминогруппой эта реакция проходит при комнатной температуре в слабокислой среде, а в случае с гидроксильной – в слабощелочной.

Наиболее распространенный флуорофор этой группы – изотиоцианат флуоресцеина (FITC). На примере хитозана были выявлены условия, когда FITC реагирует только с аминогруппами [75–79]. Реакцию, как правило, проводят в водно-органической среде. Полисахарид растворяют в воде, а FITC – в метаноле, потом смешивают растворы и добавляют уксусную кислоту. В работе Onishi et al. [75] реакцию мечения проводили в водной среде при pH 6.9, а FITC добавляли в виде порошка.

3.4. Модификация полисахаридов, содержащих карбоксильные группы

Полисахариды, содержащие карбоксильные группы, широко распространены: в растительном мире это в основном полиуроновые кислоты (пектины, альгиновые кислоты), а в животном – полисиаловые и гиалуроновые кислоты, а также гликозаминогликаны. При модификации карбоновые кислоты можно превратить в эфиры, амиды, ацилгидразиды или гидроксамовые кислоты.

На рис. 5 приведены два варианта присоединения флуорофора через карбоксильную группу.

Наиболее популярный метод – введение метки созданием амидной связи с использованием карбодимидных активаторов карбоксильных групп (рис. 5, реакция a) [80–82]. Мечение проводят в водных растворах при pH 4.5–5.0.

Почти в таких же условиях можно вводить гидразиновое производное флуорофора. Так, например, гепарин и хондроитинсульфат, представляющие собой полимеры из L-идуроновой и D-глюкуроновой кислот, модифицировали с помощью гидразидного производного флуоресцеина. Модификация по карбоксильным группам проходила в водном растворе при pH 5 и 37°C за 3 ч [83].

Для введения флуоресцентной метки путем создания сложноэфирной связи используют

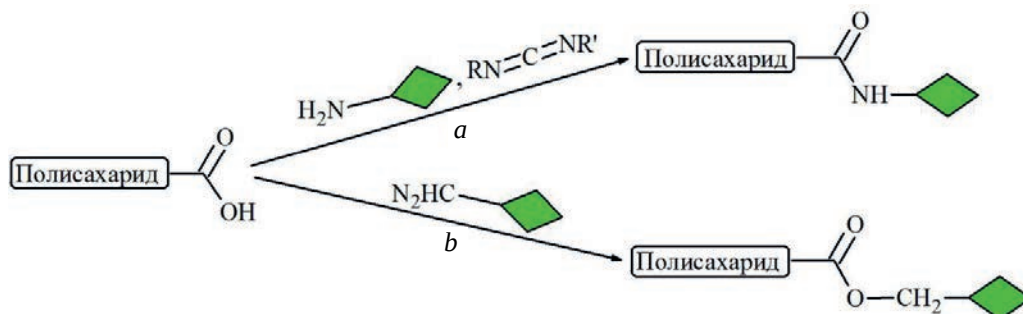


Рис. 5. Введение флуоресцентной метки по карбоксильной группе: путем активации карбодимидом (a), реакция с диазометаном (b).

производные диазометана (рис. 5, реакция b), например, такие как флуоренилдиазометан [84–86] или пиренилдиазометан [87]. Флуоренилдиазометаном [84, 85] метили целлюлозу, которую растворяли в диметилацетамиде с хлористым литием (для разрушения водородных связей). Реакции производных диазометана проводят в органических растворителях (диметилацетамид, этилацетат-метанол), т.к. приведенные флуорофобы не растворяются в воде. Несмотря на это, производные диазометана обладают важным преимуществом – они реагируют в нейтральной среде при комнатной температуре.

Следует отметить, что флуоренилдиазометан используют для оценки содержания карбоксильных групп в бумажной массе (суспензии волокон целлюлозы в воде, используемой для получения бумаги) [85].

3.5. Использование методов клик-химии

Начиная с 2000-х гг., для введения флуоресцентных меток стали активно использовать методы клик-химии (Click chemistry) [88]. Этот термин был впервые ввел К.В. Sharpless в 2001 г. [89]. Клик-реакции можно отнести к так называемым биоортогональным, т.е. химическим реакциям, которые способны протекать внутри живых систем, не мешая естественным биохимическим процессам. Это понятие предложила С.Р. Bertozzi, получившая Нобелевскую премию в 2022 г. [90]. С помощью биоортогональных реакций были разработаны методы визуализации углеводов в живых организмах для изучения процессов клеточной адгезии и передачи сигналов [91, 92].

Функциональные группы, участвующие в биоортогональных реакциях, как правило, не встречаются в биомолекулах, но способны быстро и селективно реагировать друг с другом в условиях живой клетки; при этом они инертны по отношению к другим соединениям, которые присутствуют в организме. Обычно в углевод вводят функциональную группу (чаще всего азидную) и помещают в клетки и в живые организмы, где он интегрируется в биосинтетические/биохимические процессы. Потом вводят флуоресцентную метку, которая имеет функцию, подходящую для клик-реакции (для углевода с азидом часто используют ацетиленовую группу) [93–99].

Использование методов клик-химии привело к значительному прогрессу методов введения флуоресцентных меток в ПС, наибольшее распространение получила реакция азид-алкинового циклоприсоединения.

Азид-алкиновое циклоприсоединение. Для осуществления азид-алкинового циклоприсоединения (рис. 6) при мечении полисахаридов необходимо подготовить два реагента, содержащих азидную и алкиновую группы. Азидную группу вводят обычно в две стадии. Первая стадия – тозилрование или бромирование гликана, вторая – замещение введенных на первой стадии групп на азид. Реакции, как правило, проводят в апротонных растворителях, таких как диметилсульфоксид, диметилформамид и диметилацетамид [100–104]. Ацетиленовую группу вводят тремя способами. Первый способ заключается в алкилировании пропаргилбромидом алкоголята полисахарида в диметилацетамиде или в воде [103]; второй – реакция пропаргиламина с тозилрованным

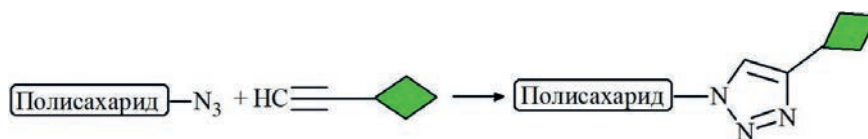


Рис. 6. Введение метки с помощью азид-алкинового циклоприсоединения.

полисахаридом в диметилформамиде [104]; третий – это этерификация полисахарида ацетилен-карбоновыми кислотами в условиях кислотного катализа [105, 106].

В случаях с ПС, имеющими восстанавливающий конец, проводят восстановительное аминирование для введения групп, участвующих в клик-реакции. Например, ацетиленовую группу вводят реакцией с пропаргиламином (как было описано ранее в п. “Взаимодействие с аминами”) [107]. Известны методы введения функциональных групп в полисахариды для клик-реакций с помощью карбонилдиимидазола (рис. 7) [108]. Полученные карбонаты гидролизуются в физиологических условиях (рН 7.2, 37°C) от двух дней до двух месяцев [109].

Для устранения невысокой стабильности карбонатов предложен метод введения азидной группы реакцией 1-(6-азидогексаноил)-1*H*-имидазола с декстраном в диметилсульфоксиде. В результате получается азид, присоединенный к полисахариду сложноэфирной связью, которая более стабильна, чем карбонат. 1-(6-Азидогексаноил)-1*H*-имидазол получается взаимодействием карбонилдиимидазола с азидокапроновой кислотой [110].

Для введения азидной группы на поверхности нанофибриллярной целлюлозы в водно-спиртовой среде при комнатной температуре предложено использовать 1-азидо-2,3-эпоксипропан (рис. 8) [111]. Полученные производные далее вводили в клик-реакцию с целью получения новых материалов, а также для введения флуоресцентной метки.

Ключевой момент для клик-реакции – выбор медного катализатора. Его можно ввести сразу в виде одновалентной меди, например, CuBr [112], или медь можно использовать в виде двухвалентной соли (CuBr₂) вместе с восстановителем, например, аскорбиновой кислотой [113]. Часто в реакцию добавляют *N,N,N',N'',N''*-пентаметилдиэтиленetriамин (PMDETA) [98, 112, 113], вероятно, для предотвращения окисления или диспропорционирования одновалентной меди. Клик-реакция может проходить и без PMDETA. Например, показано, что реакции можно проводить в DMSO, *N*-метилпирролидоне [101], тетрагидрофуране [114], водно-органической среде [105], растворе соляной кислоты [115] и ионной жидкости (ацетат 1-этил-3-метилимидазолия) [116].

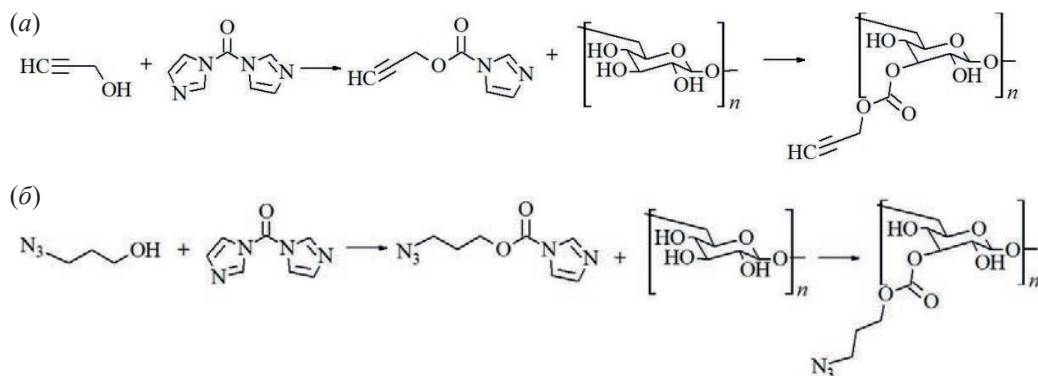


Рис. 7. Введение функциональных групп для клик-реакции с помощью карбонилдиимидазола: (а) – синтез пропаргил-карбоната декстрана, (б) – синтез азидопропилкарбоната декстрана.

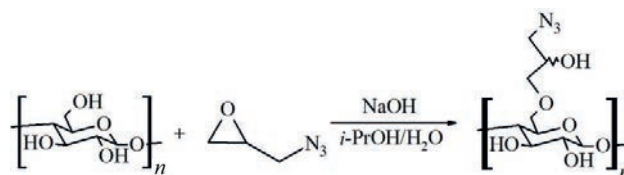


Рис. 8. Получение целлюлозы с азидной группой с помощью 1-азидо-2,3-эпоксипропан.

Следует отметить, что соли меди обладают цитотоксичностью, что делает ее применение ограниченным. Отрицательное воздействие можно уменьшить использованием комплексов меди [117] или осуществить безмедное азид-алкиновое циклоприсоединение. Ускорение реакции может быть достигнуто не только путем использования катализатора, но и повышением реакционной способности алкина. Введение в реакцию с азидами напряженного циклооктина улучшает кинетику реакции и позволяет проводить циклоприсоединение в отсутствие медного катализатора. Эта реакция протекает с более высокой скоростью за счет снятия углового напряжения в молекуле циклооктина при образовании продукта присоединения [118].

Реакция с тетразолами. В результате воздействия ультрафиолетового света на производные тетразола образуются реакционноспособные нитрил-имины, которые вступают с олефинами в реакцию циклоприсоединения (рис. 9). Например, для введения метки перацетилованный маннозамин ацилировали акрилоилхлоридом и вводили в культуру клеток, где он включался в биосинтез различных гликоконъюгатов, а также ПС. Флуоресцентную метку вводили с помощью фотоклик-реакции уже непосредственно в клетке,

что удобно для изучения локализации меченых молекул [119].

Лигирование по Штаудингеру. Реакция Штаудингера – это метод синтеза фосфазенов путем взаимодействия азидов с фосфинами. Образовавшиеся в реакции фосфазены легко гидролизуются, образуя амин и фосфиноксид. Модификация этой реакции – лигирование по Штаудингеру – широко применяется в области химической биологии и биоконъюгации для ковалентного связывания биомолекул с низкомолекулярными метками, а также для мечения клеток в живых организмах. Участвующие в реакции функциональные группы (азид и фосфин) практически не представлены в организмах, поэтому считается, что они не способны взаимодействовать с природными соединениями. Лигирование по Штаудингеру стало первым примером биоортогональной реакции, способной протекать в клетках живых организмов, не мешая естественным биохимическим процессам. Модификация C.R. Bertozzi состоит во введении в один из арильных заместителей фосфина сложноэфирной группы в качестве электрофильной ловушки. В результате образуется прочная амидная связь между фрагментом биомолекулы и введенной меткой (рис. 10a) [120].

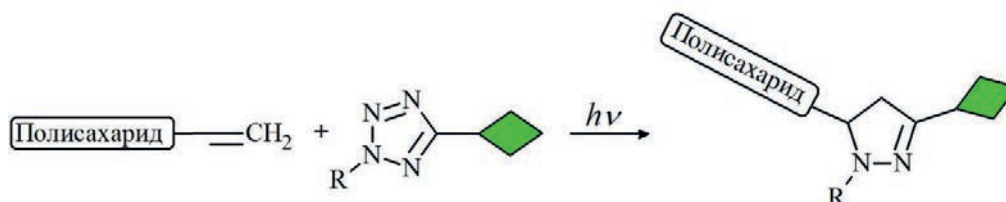


Рис. 9. Схема фотоклик-реакции с тетразолом.

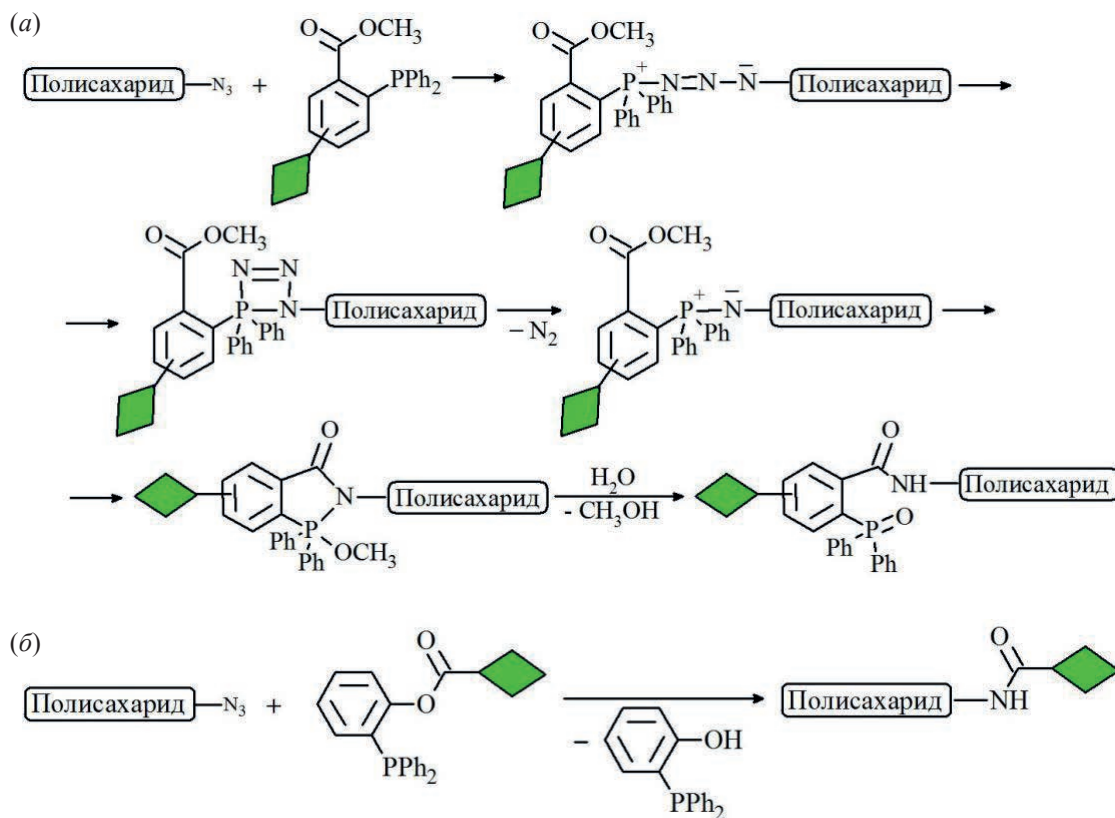


Рис. 10. Реакция Штаудингера: (а) – лигирование по Штаудингеру, (б) – бесследовое лигирование по Штаудингеру.

Для введения метки азидсодержащий моносахарид (ацетилированные *N*-азидоацетилманнозамин, *N*-азидоацетилгалактозамин, *N*-азидоацетилглюкозамин или 6-азидофукозамин) вводят в культуру клеток или в живой организм, где он включается в биосинтез различных ПС и гликоконъюгатов. После чего проводят лигирование по Штаудингеру с флуорофором, содержащим трифенилфосфиновую группу [93, 96, 121]. Трифенилфосфин нерастворим в воде, поэтому метку добавляют в растворителе, например в тетрагидрофуране, или вводят в ее состав водорастворимый заместитель (олигоэтиленгликоль или сульфогруппу) [122].

Несмотря на то, что разработанная методика лигирования по Штаудингеру хорошо зарекомендовала себя в биологических объектах, предпочтение отдается модификации, в которой неприродный фосфиноксид выводится из системы – так называемое бесследовое лигирование по Штаудингеру, в котором трифенилфосфиноксид легко удаляется.

Для этого проводят модификацию реагентов таким образом, чтобы фосфин оказывался в спиртовой части сложного эфира и отщеплялся при атаке нуклеофильного атома азота иминофосфоранового интермедиата (рис. 10б) [123–126].

4. МЕТОДЫ ВВЕДЕНИЯ ФЛУОРОФОРОВ НА ОСНОВЕ ЛАНТАНОИДОВ

Для присоединения комплексов лантаноидов к биомолекулам используют лиганды с функциональными группами (например, с изотиоцианатом и дихлоротриазиним). На рис. 11 приведены примеры таких бифункциональных лигандов для лантаноидов [127–130]. С их помощью метку можно вводить в ПС описанными выше методами (см. п. “Взаимодействие с цианатами”, “Взаимодействие с триазиновым производным флуорофора” и Взаимодействие с изотиоцианатами”). Например, Xiao et al. [131] к молекуле арабиногалактана последовательно присоединяли хлоруксусную кислоту, этилендиамин и лиганд –

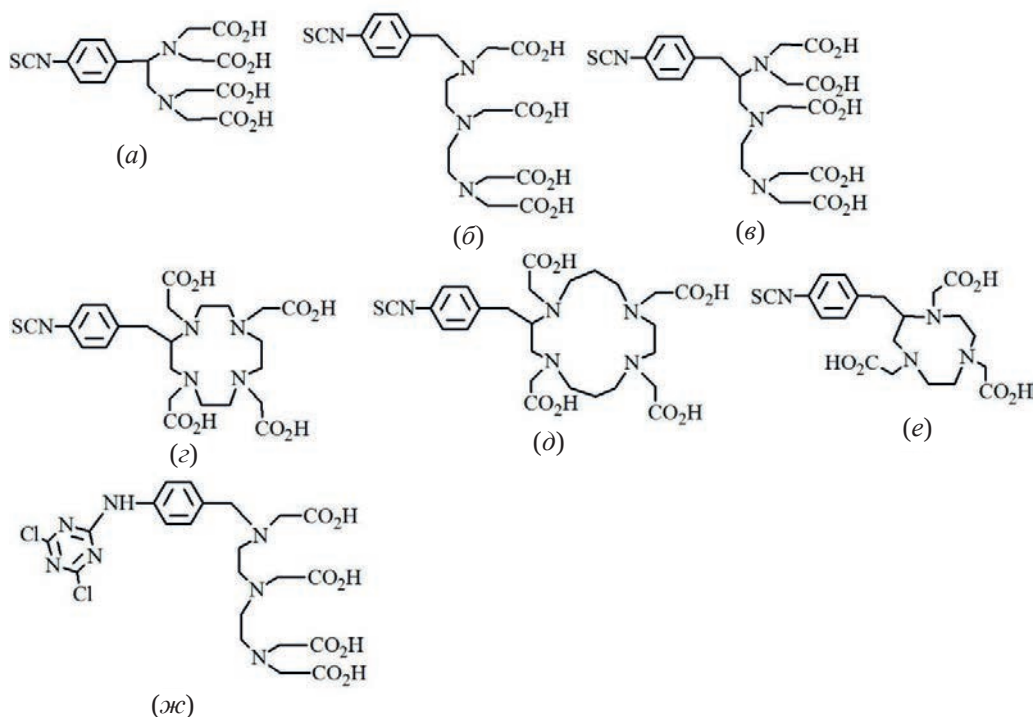


Рис. 11. Бифункциональные лиганды для лантаноидных меток: изотиоцианатофенилэтилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) [126, 127] (а), изотиоцианатобензилдиэтилентриаминтетрауксусная кислота (DTTA) [126, 127] (б), изотиоцианатобензилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (DTPA) [126–128] (в), изотиоцианатобензилтетрааза-циклододекануксусная кислота (DOTA) [126, 129] (г), изотиоцианатобензилтетрааза-циклотетрадекануксусная кислота (TETA) [126, 129] (д), изотиоцианатобензилтриаза-циклононануксусная кислота (NOTA) [129] (е), дихлоротриазино-аминобензилдиэтилентриаминтетрауксусная кислота (DTTA) [128] (жс).

1,4,7,10-терааза-циклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (DOTA), а затем вводили ион тербия. В другой работе к меченому таким же образом декстрану присоединяли аминированный низкомолекулярный фукоидан (сильно сульфатированный гетерополисахарид, используемый здесь для таргетинга) с помощью *N*-гидроксисукцинимидного эфира. Образовавшийся конъюгат авторы предлагают использовать для диагностики атеротромбоза [132].

5. МЕТОДЫ ВВЕДЕНИЯ ФЛЮОРОФОРОВ НА ОСНОВЕ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК

Для возможности использования неорганических КТ в качестве меток их обрабатывают бифункциональными молекулами, содержащими сульфгидрильные группы для закоривания на оболочке (например, из сульфида цинка) с одной стороны и карбоксильные, гидроксильные

или аминогруппы с другой для конъюгации с биомолекулами [14, 133–135]. Для введения функциональных групп углеродные КТ подвергают химическому или электрохимическому окислению. Образующиеся в результате карбоксильные группы используют для конъюгации [136–138].

Самый большой недостаток обоих типов КТ – мультивалентность, трудно ввести только одну функциональную группу на поверхности. Некоторые исследователи решают эту проблему строгим соблюдением стехиометрического соотношения КТ и биомолекулы [139]. Есть работы по разделению получаемой смеси меченых молекул, например, с помощью электрофореза [140], однако КТ могут выступать в этих реакциях в роли сшивающих реагентов, что усложняет ситуацию. И хотя КТ уже используют для маркировки клеточных органелл [22], для мечения полисахаридов их пока не применяют.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как следует из приведенного выше материала, мечение ПС получило широкое применение, а для подлежащих мечению ПС наблюдается значительное структурное разнообразие. В зависимости от природы полисахарида, флуоресцентную метку вводят по альдегидной, гидроксильной, карбоксильной или аминогруппе. Самое очевидное и специфическое (поскольку эту реакцию можно проводить избирательно даже в смеси с молекулами, несущими другие функциональные группы) – введение метки по альдегидной группе полисахаридов. Этот метод автоматически решает и проблему стехиометрии ПС/метка, т.к. альдегидная группа в цепи только одна. Наиболее стабильные продукты получаются при использовании метода восстановительного аминирования, а использование 2-(метиламиноокси)этанамина позволяет сохранить циклическую форму восстанавливающего конца.

Однако не все ПС являются восстанавливающими, кроме того, с ростом молекулярного веса молекулы (а он может достигать нескольких тысяч кДа) эффективность мечения по восстанавливающему концу ПС падает. Модификация гидроксильных и карбоксильных групп хоть и не специфическая, тем не менее относительно простая, и выбор вариантов мечения (и доступных флуорофоров) здесь очень большой, среди которых предпочтение следует отдать тем, которые позволяют проводить реакцию в водной среде, как, например, при использовании триазиновых производных флуорофоров. Следует лишь отметить необходимость контроля стехиометрии (см. выше). Реакции по аминогруппе также можно считать специфическими, т.к. эта группа присутствует далеко не во всех полисахаридах, что позволяет метить их избирательно.

Если речь идет о детекции полисахаридов в живой системе, то вводить флуорофор имеет смысл с помощью биоортогональных реакций, т.к. они способны протекать внутри живых систем, не мешая естественным биохимическим процессам. При этом следует принимать во внимание и особенности объекта, т.к. высокая гидрофобность некоторых молекул-флуорофоров может вызывать значимое неспецифическое взаимодействие либо влиять на фармакинетику [141].

Большинство подходов к визуализации полисахаридов основаны на использовании флуоресцентных органических флуорофоров-меток. Органические флуорофоры – крупнейший класс флуоресцентных соединений. Это относительно небольшие (молекулярная масса большинства органических флуорофоров <1 кДа) органические вещества, содержащие несколько ароматических фрагментов и необходимые для мечения функциональные группы. Достоинство органических флуорофоров – их моновалентность, т.е. присутствует лишь одна группа, необходимая для реакции с полисахаридом. Основные работы по мечению ПС выполнены именно с органическими флуорофорами.

Несмотря на вышеизложенное, органические флуорофоры имеют ряд недостатков, таких как низкая химическая стабильность, фотообесцвечивание, широкие спектры излучения. В этой связи более привлекательным выглядит использование комплексов лантаноидов, обладающих фотостабильностью и продолжительным временем флуоресценции. Это позволяет исключить сигналы других флуорофоров путем введения временной задержки (10–200 мкс) между временем возбуждения и измерения флуоресценции (time-resolved fluorescence). Кроме того, комплексы лантаноидов позволяют проводить детекцию в длинноволновом диапазоне, проникающим через живые ткани. Следует, однако, отметить, что методы введения меток на основе комплексов лантаноидов менее отработаны.

Квантовые неорганические и углеродные точки были разработаны для замены обычных органических флуорофоров. Они обладают высокой фотостабильностью, настраиваемой длиной волны излучения за счет регулирования размера частиц, широкими полосами возбуждения, что позволяет возбуждать нанокристаллы разных цветов одним источником излучения, и узкими спектрами излучения. Это открывает возможность для мультиплексной детекции, т.е. для наблюдения за несколькими объектами одновременно. Теоретически КТ можно “оснастить” практическими любыми функциональными группами, что делает их гибкими, легко подстраиваемыми под задачу, хотя отметим, что ввести на поверхность КТ строго контролируемое количество функциональных

групп практически невозможно. По-видимому, именно мультивалентность препятствует широкому применению КТ в качестве флуоресцентных меток, в том числе и для мечения полисахаридов.

Работы по мечению полисахаридов комплексами лантаноидов и КТ практически отсутствуют, однако благодаря тому, что они выгодно отличаются от своих органических аналогов по флуоресцентным свойствам, стабильности и гибкости в модификации, их потенциал в будущем наверняка будет реализован.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-63-47110).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Held M.A., Jiang N., Basu D., Showalter A.M., Faik A. // In: Polysaccharides / Eds. Ramawat K., Mérillon J.M. Springer, Cham, 2014. P. 1–47. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03751-6_73-1
2. Mbongue J.C., Vanterpool E., Firek A., Langridge W.H.R. // Immuno. 2022. V. 2. P. 482–500. <https://doi.org/10.3390/immuno2030030>
3. Alexander C., Rietschel E.T. // J. Endotoxin Res. 2001. V. 7. P. 167–202.
4. Olivera-Ardid S., Khasbiullina N., Nokel A., Formanovsky A., Popova I., Tyrtysheva T., Kunetskiy R., Shilova N., Bovin N., Bello-Gil D., Mañez R. // J. Vis. Exp. 2019. V. 144. e57662. <https://doi.org/10.3791/57662>
5. Khasbiullina N.R., Bovin N.V. // Biochem. 2015. V. 80. P. 820–835. <https://doi.org/10.1134/S0006297915070032>
6. Tuzikov A.B., Rapoport E.M., Khaidukov S.V., Nokel E.A., Knirel Y.A., Bovin N.V. // Glycoconj. J. 2021. V. 38. P. 369–374. <https://doi.org/10.1007/s10719-021-09993-9>
7. Principles of Fluorescence Spectroscopy / Ed. Lakowicz J.R. Springer New York, NY, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
8. Cabral Campello M.P., Palma E., Correia I., Paulo P.M.R., Matos A., Rino J., Coimbra J., Pessoa J.C., Gambino D., Paulo A., Marques F. // Dalton Trans. 2019. V. 48. P. 4611–4624. <https://doi.org/10.1039/c9dt00640k>
9. Weissman S.I. // J. Chem. Phys. 1942. V. 10. P. 214–217. <https://doi.org/10.1063/1.1723709>
10. Bayer M. // Ann. Phys. 2019. V. 531. P. 900039. <https://doi.org/10.1002/andp.201900039>
11. Dumas E., Gao C., Suffern D., Bradforth S.E., Dimitrijevic N.M., Nadeau J.L. // Environ. Sci. Technol. 2010. V. 44. P. 1464–1470. <https://doi.org/10.1021/es902898d>
12. Gulia S., Kakkar R. // Adv. Mat. Lett. 2013. V. 4. P. 876–887. <https://doi.org/10.5185/amlett.2013.3440>
13. Granada-Ramírez D.A., Arias-Cerón J.S., Rodríguez-Fragoso P., Vázquez-Hernández F., Luna-Arias J.P., Herrera-Perez J.L., Mendoza-Álvarez J.G. // Nanobio-materials. 2018. P. 411–436. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100716-7.00016-7>
14. Xing Y., Rao J. // Cancer Biomarkers. V. 4. P. 307–319. <https://doi.org/10.3233/CBM-2008-4603>
15. Sukhanova A., Venteo L., Devy J., Artemyev M., Oleinikov V., Pluot M., Nabiev I. // Lab. Invest. 2002. V. 82. P. 1259–1261. <https://doi.org/10.1097/01.LAB.0000027837.13582.E8>
16. Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.П. // Рос. нанотехнологии. 2007. Т. 2. № 1–2. С. 160–173.
17. Xu X., Ray R., Gu Y., Ploehn H.J., Gearheart L., Raker K., Scrivens W.A. // J. Am. Chem. Soc. 2004. V. 126. P. 12736–12737. <https://doi.org/10.1021/ja040082h>
18. Sun Y.P., Zhou B., Lin Y., Wang W., Fernando K.A.S., Pathak P., Mezzani M.J., Harruff B.A., Wang X., Wang H., Luo P.G., Yang H., Kose M.E., Chen B., Veca L.M., Xie S. // J. Am. Chem. Soc. 2006. V. 128. P. 7756–7757. <https://doi.org/10.1021/ja062677d>
19. Diaz-Diestra D., Thapa B., Badillo-Diaz D., Beltrán-Huarc J., Morell G., Weiner B.R. // Nanomaterials. 2018. V. 8. P. 1–18. <https://doi.org/10.3390/nano8070484>

20. Zhu H., Wang X., Li Y., Wang Z., Yang F., Yang X. // *Chem. Commun.* 2009. V. 34. P. 5118–5120.
<https://doi.org/10.1039/b907612c>
21. Li H., Ming H., Liu Y., Yu H., He X., Huang H., Pan K., Kang Z., Lee S.T. // *New J. Chem.* 2011. V. 35. P. 2666–2670.
<https://doi.org/10.1039/c1nj20575g>
22. Liu M.L., Yang L., Li R.S., Chen B.B., Liu H., Huang C.Z. // *Green Chem.* 2017. V. 19. P. 3611–3617.
<https://doi.org/10.1039/c7gc01236e>
23. Hess W.M., Herd C.R. // In: *Carbon Black* / Ed. Donnet J.-B. Marcel Dekker Inc. 1993. P. 89–173.
<https://doi.org/10.1201/9781315138763-3>
24. Xiao L., Wang Y., Huang Y., Wong T., Sun H. // *Nanoscale*. 2017. V. 9. P. 12637–12646.
<https://doi.org/10.1039/c7nr03913a>
25. Tsien R.Y. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. P. 927–932.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.025>
26. Song Y.R., Sung S.K., Jang M., Lim T.G., Cho C.W., Han C.J., Hong H.D. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 116. P. 1089–1097.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.132>
27. Meunier F., Wilkinson K.J. // *Biomacromolecules*. 2002. V. 3. P. 857–864.
<https://doi.org/10.1021/bm0255241>
28. O'Shea M.G., Morell M.K. // *Electrophoresis*. 1996. V. 17. P. 681–686.
<https://doi.org/10.1002/elps.1150170410>
29. Nakajima K., Oda Y., Kinoshita M., Masuko T., Kakehi K. // *Analyst*. 2002. V. 127. P. 972–976.
<https://doi.org/10.1039/b202950b>
30. Partyka J., Krenkova J., Cmelik R., Foret F. // *J. Chromatogr. A*. 2018. V. 1560. P. 91–96.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.05.030>
31. Song X., Xia B., Stowell S.R., Lasanajak Y., Smith D.F., Cummings R.D. // *Chem. Biol.* 2009. V. 16. P. 36–47.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.11.004>
32. Yoshida T., Lee Y.C. // *Carbohydr. Res.* 1994. V. 251. P. 175–186.
[https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)84284-1](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)84284-1)
33. Ruhaak L.R., Steenvoorden E., Koeleman C.A.M., Deelder A.M., Wührer M. // *Proteomics*. 2010. V. 10. P. 2330–2336.
<https://doi.org/10.1002/pmic.200900804>
34. Cosenza V.A., Navarro D.A., Stortz C.A. // *Arkivoc*. 2011. № 7. P. 182–194.
<https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0012.716>
35. Ruhaak L.R., Wührer M. // Patent EP2306199A1, published 06.04.2011.
36. Burkhardt E.R., Coleridge B.M. // *Tetrahedron Lett.* 2008. V. 49. P. 5152–5155.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.06.095>
37. Li P., Li C., Xue Y., Zhang Y., Liu H., Zhao X., Yu G., Guan H. // *J. Ocean Univ. China*. 2014. V. 13. P. 683–690.
<https://doi.org/10.1007/s11802-014-2273-6>
38. Fry S.C. // *Plant J.* 1997. V. 11. P. 1141–1150.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.1997.11051141.x>
39. Seo J.H., Kim C.S., Hwang B.H., Cha H.J. // *Nanotechnology*. 2010. V. 21. P. 215101.
<https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/21/215101>
40. Alley W.R., Mann B.F., Hruska V., Novotny M.V. // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. P. 10408–10416.
<https://doi.org/10.1021/ac4023814>
41. Likhoshesterov L.M., Novikova O.S., Derevitskaja V.A., Kochetkov N.K. // *Carbohydr. Res.* 1986. V. 146. P. C1–C5.
[https://doi.org/10.1016/0008-6215\(86\)85037-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(86)85037-6)
42. Tang J.S.J., Schade K., Tepper L., Chea S., Ziegler G., Rosencrantz R.R. // *Molecules*. 2020. V. 25. P. 1–14.
<https://doi.org/10.3390/molecules25215121>
43. Likhoshesterov L.M., Novikova O.S., Shibaev V.N. // *Dokl. Chem.* 2002. V. 838. P. 89–92.
<https://doi.org/10.1023/A:1015428720733>
44. Likhoshesterov L.M., Novikova O.S., Shibaev V.N. // *Dokl. Chem.* 2003. V. 389. P. 73–76.
<https://doi.org/10.1023/A:1023484306457>
45. Likhoshesterov L.M., Novikova O.S., Zheltova A.O., Shibaev V.N. // *ChemInform*. 2004. V. 35. P. 709–713.
<https://doi.org/10.1002/chin.200452177>
46. Manger I.D., Wong S.Y.C., Rademacher T.W., Dwek R.A. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 10733–10740.
<https://doi.org/10.1021/bi00159a013>
47. Likhoshesterov L.M., Novikova O.S., Kolytyrkina N.G., Yamskov I.A., Piskarev V.E. // *Russ. Chem. Bull.* 2014. V. 63. P. 507–510.
<https://doi.org/10.1007/s11172-014-0461-6>
48. Likhoshesterov L.M., Novikova O.S., Kolytyrkina N.G., Piskarev V.E. // *Russ. Chem. Bull.* 2019. V. 68. P. 411–415.
<https://doi.org/10.1007/s11172-019-2401-y>

49. Bohorov O., Andersson-Sand H., Hoffmann J., Blixt O. // *Glycobiology*. 2006. V. 16. P. 21C–27C. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl044>
50. Lattová E., Perreault H. // *Mass Spectrom. Rev.* 2013. V. 32. P. 366–385. <https://doi.org/10.1002/mas.21367>
51. Hull S.R., Turco S.J. // *Anal. Biochem.* 1985. V. 146. P. 143–149. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90408-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90408-7)
52. Shinohara Y., Sota H., Gotoh M., Hasebe M., Tosu M., Nakao J., Hasegawa Y., Shiga M. // *Int. J. Comput. Vis.* 1996. V. 18. P. 2573–2579.
53. Ingham K.C., Brew S.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1981. V. 670. P. 181–189. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(81\)90007-6](https://doi.org/10.1016/0005-2795(81)90007-6)
54. Ridley B.L., Spiro M.D., Glushka J., Albersheim P., Darvill A., Mohnen D. // *Anal. Biochem.* 1997. V. 249. P. 10–19. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2165>
55. Zhang Y., Wang Z., Zhang X., Zhou W., Huang L. // *Carbohydr. Res.* 2011. V. 346. P. 2156–2164. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.07.014>
56. Dimakos V., Taylor M.S. // *Chem. Rev.* 2018. V. 118. P. 11457–11517. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00442>
57. Georges L.W., Carl H. // Patent US2428843A, published 14.10.1947.
58. Abushammala H., Mao J.A. // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 2782. <https://doi.org/10.3390/molecules24152782>
59. Янкаускайте Д.П., Дикчювене А.А., Паулюконис А.-А.Б., Глемжа А.-С.А. // Авторское свидетельство СССР № 732278, опубл. 05.05.1980.
60. de Belder A.N., Granath K. // *Carbohydr. Res.* 1973. V. 30. P. 375–378. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)81824-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)81824-8)
61. Unnikrishnan B.S., Preethi G.U., Sreeranganathan M., Syama H.P., Archana M.G., Sreelekha T.T. // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2019. V. 52. P. 863–869. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.06.009>
62. Sun M., Su F., Yang J., Gao Z., Geng Y. // *Polymers (Basel)*. 2018. V. 10. P. 372. <https://doi.org/10.3390/polym10040372>
63. Abitbol T., Palermo A., Moran-Mirabal J.M., Cranston E.D. // *Biomacromolecules*. 2013. V. 14. P. 3278–3284. <https://doi.org/10.1021/bm400879x>
64. Heyna J. // *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.* 1963. V. 2. P. 20–23. <https://doi.org/10.1002/anie.196300201>
65. Park J.W., Kim Y., Lee K.J., Kim D.J. // *Bioconjug. Chem.* 2012. V. 23. P. 350–362. <https://doi.org/10.1021/bc200232d>
66. Cheng F., Shang J., Ratner D.M. // *Bioconjug. Chem.* 2011. V. 22. P. 50–57. <https://doi.org/10.1021/bc1003372>
67. Knirel Y.A., Vinogradov E.V., Shashkov A.S., Dmitriev B.A., Kochetkov N.K., Stanislavsky E.S., Mashilova G.M. // *Eur. J. Biochem.* 1982. V. 125. P. 221–227. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06672.x>
68. Yi W., Bystricky P., Yao Q., Guo H., Zhu L., Li H., Shen J., Li M., Ganguly S., Bush C.A., Wang P.G. // *Carbohydr. Res.* 2006. V. 341. P. 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.11.001>
69. Perepelov A.V., Zhu H., Senchenkova S.N., Wang Q., Shashkov A.S., Wang L., Knirel Y.A. // *Carbohydr. Res.* 2011. V. 346. P. 2812–2815. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.09.013>
70. Perepelov A.V., Shekht M.E., Liu B., Shevelev S.D., Ledov V.A., Senchenkova S.N., L'vov V.L., Shashkov A.S., Feng L., Aparin P.G., Wang L., Knirel Y.A. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012. V. 66. P. 201–210. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.01000.x>
71. Plumbridge J. // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 25. P. 154–167. <https://doi.org/10.1159/000369583>
72. Carbohydrate Structure Database. <http://csdb.glycoscience.ru/database/>
73. Lee S., Jo G., Jung J.S., Yang D.H., Hyun H. // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2020. V. 48. P. 1144–1152. <https://doi.org/10.1080/21691401.2020.1817054>
74. Aqueel M.S., Pathak V., Pathak A.K. // *Tetrahedron Lett.* 2008. V. 49. P. 7157–7160. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.09.164>

75. Onishi H., Machida Y. // *Biomaterials*. 1999. V. 20. P. 175–182.
[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00159-8)
76. Qaqish R.B., Amiji M.M. // *Carbohydr. Polym.* 1999. V. 38. P. 99–107.
[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00109-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00109-X)
77. Huang M., Ma Z., Khor E., Lim L.Y. // *Pharm. Res.* 2002. V. 19. P. 1488–1494.
<https://doi.org/10.1023/a:1020404615898>
78. Jiayin Z., Jianmin W., Chinese J. // *Anal. Chem.* 2006. V. 34. P. 1555–1559.
[https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(07\)60015-2](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(07)60015-2)
79. Moussa S.H., Tayel A.A., Al-Turki A.I. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2013. V. 54. P. 204–208.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.12.029>
80. Mechref Y., El Rassi Z. // *Electrophoresis*. 1994. V. 15. P. 627–634.
<https://doi.org/10.1002/elps.1150150187>
81. Kobayashi M., Ichishima E. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1992. V. 56. P. 186–189.
<https://doi.org/10.1271/bbb.56.186>
82. Kobayashi M., Chiba Y. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1994. V. 58. P. 271–274.
<https://doi.org/10.1271/bbb.58.271>
83. Han Z.R., Wang Y.F., Liu X., Wu J.D., Cao H., Zhao X., Chai W.G., Yu G.L. // *Chinese J. Anal. Chem.* 2011. V. 39. P. 1352–1357.
[https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(10\)60470-7](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(10)60470-7)
84. Bohrn R., Potthast A., Rosenau T., Sixta H., Kosma P. // *Synlett*. 2005. № 20. P. 3087–3090.
<https://doi.org/10.1055/s-2005-921923>
85. Bohrn R., Potthast A., Schiehser S., Rosenau T., Sixta H., Kosma P. // *Biomacromolecules*. 2006. V. 7. P. 1743–1750.
<https://doi.org/10.1021/bm060039h>
86. Hutterer C., Fackler K., Potthast A. // *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2017. V. 5. P. 1818–1823.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02552>
87. Nimura N., Kinoshita T., Yoshida T., Uetake A., Nakai C. // *Anal. Chem.* 1988. V. 60. P. 2067–2070.
<https://doi.org/10.1021/ac00170a017>
88. Stephens D.J., Allan V.J. // *Science*. 2003. V. 300. P. 82–86.
<https://doi.org/10.1126/science.1082160>
89. Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B. // *Angew. Chemie*. 2001. V. 40. P. 2004–2021.
[https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5)
90. Dube D.H., Bertozzi C.R. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003. V. 7. P. 616–625.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.08.006>
91. Bird R.E., Lemmel S.A., Yu X., Zhou Q.A. // *Bioconjug. Chem.* 2021. V. 32. P. 2457–2479.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00461>
92. Carell T., Vrabel M. // *Top. Curr. Chem.* 2016. V. 374. P. 9.
<https://doi.org/10.1007/s41061-016-0010-x>
93. Prescher J.A., Dube D.H., Bertozzi C.R. // *Nature*. 2004. V. 430. P. 873–877.
<https://doi.org/10.1038/nature02791>
94. Prescher J.A., Bertozzi C.R. // *Cell*. 2006. V. 126. P. 851–854.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.017>
95. Prescher J.A., Bertozzi C.R. // *Nat. Chem. Biol.* 2005. V. 1. P. 13–21.
<https://doi.org/10.1038/nchembio0605-13>
96. Laughlin S.T., Bertozzi C.R. // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. P. 2930–2944.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.422>
97. Laughlin S.T., Bertozzi C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 12–17.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0811481106>
98. Sletten E.M., Bertozzi C.R. // *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.* 2009. V. 48. P. 6974–6998.
<https://doi.org/10.1002/anie.200900942>
99. Sletten E.M., Bertozzi C.R. // *Acc. Chem. Res.* 2011. V. 44. P. 666–676.
<https://doi.org/10.1021/ar200148z>
100. Liebert T., Hänsch C., Heinze T. // *Macromol. Rapid Commun.* 2006. V. 27. P. 208–213.
<https://doi.org/10.1002/marc.200500686>
101. Hasegawa T., Umeda M., Numata M., Li C., Bae A-H., Fujisawa T., Haraguchi S., Sakurai K., Shinkai S. // *Carbohydr. Res.* 2006. V. 341. P. 35–40.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.10.009>
102. Furuhata K. ichi, Koganei K., Chang H. S., Aoki N., Sakamoto M. // *Carbohydr. Res.* 1992. V. 230. P. 165–177.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90519-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90519-6)
103. Pierre-Antoine F., François B., Rachida Z. // *Carbohydr. Res.* 2012. V. 356. P. 247–251.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.10.028>
104. Koschella A., Hartlieb M., Heinze T. // *Carbohydr. Polym.* 2011. V. 86. P. 154–161.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.031>

105. *Hafrén J., Zou W., Córdova A.* // *Macromol. Rapid Commun.* 2006. V. 27. P. 1362–1366.
<https://doi.org/10.1002/marc.200600328>
106. *Krouit M., Bras J., Belgacem M.N.* // *Eur. Polym. J.* 2008. V. 44. P. 4074–4081.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.09.016>
107. *Schatz C., Louguet S., Le Meins J.F., Lecommandoux S.* // *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.* 2009. V. 48. P. 2572–2575.
<https://doi.org/10.1002/anie.200805895>
108. *De Geest B.G., Van Camp W., Du Prez F.E., De Smedt S.C., Demeester J., Hennink W.E.* // *Chem. Commun. (Camb).* 2008. № 2. P. 190–192.
<https://doi.org/10.1039/b714199h>
109. *Van Dijk-Wolthuis W.N.E., Hoogeboom J.A.M., Van Steenbergen M.J., Tsang S.K.Y., Hennink W.E.* // *Macromolecules.* 1997. V. 30. P. 4639–4645.
<https://doi.org/10.1021/ma9704018>
110. *Laville M., Babin J., Londono I., Legros M., Nouvel C., Durand A., Vanderesse R., Leonard M., Six J.L.* // *Carbohydr. Polym.* 2013. V. 93. P. 537–546.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.050>
111. *Pahimanolis N., Hippi U., Johansson L.S., Saarinen, T., Houbenov N., Ruokolainen J., Seppälä J.* // *Cellulose.* 2011. V. 18. P. 1201–1212.
<https://doi.org/10.1007/s10570-011-9573-4>
112. *Yuan W., Li X., Gu S., Cao A., Ren J.* // *Polymer (Guildf).* 2011. V. 52. P. 658–666.
<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.12.052>
113. *Yuan W., Zhao Z., Gu S., Ren J.* // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 2010. V. 48. P. 3476–3486.
<https://doi.org/10.1002/pola.24136>
114. *Montañez M.I., Hed Y., Utsel S., Ropponen J., Malmström E., Wågberg L., Hult A., Malkoch M.* // *Biomacromolecules.* 2011. V. 12. P. 2114–2125.
<https://doi.org/10.1021/bm200201y>
115. *Bao H., Li L., Gan L.H., Ping Y., Li J., Ravi P.* // *Macromolecules.* 2010. V. 43. P. 5679–5687.
<https://doi.org/10.1021/ma100894p>
116. *Heinze T., Schöbitz M., Pohl M., Meister F.* // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 2008. V. 46. P. 3853–3859.
<https://doi.org/10.1002/pola.22697>
117. *Kennedy D.C., Pezacki J.P., Pegoraro A.F., Legault M.C.B., Danielson D.C., McKay C.S., Blake J.A., Mester Z., Stalow A.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. V. 133. P. 17993.
<https://doi.org/10.1021/ja2083027>
118. *Dehnert K.W., Baskin J.M., Laughlin S.T., Beahm B.J., Naidu N.N., Amacher S.L., Bertozzi C.R.* // *Chem-biochem.* 2012. V. 13. P. 353–357.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201100649>
119. *Schart V.F., Hassenrück J., Späte A.K., Dold J.E.G.A., Fahrner R., Wittmann V.* // *Chembiochem.* 2019. V. 20. P. 166–171.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201800740>
120. *Lin F.L., Hoyt H.M., Van Halbeek H., Bergman R.G., Bertozzi C.R.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 2686–2695.
<https://doi.org/10.1021/ja044461m>
121. *Laughlin S.T., Agard N.J., Baskin J.M., Carrico I.S., Chang P.V., Ganguli A.S., Hangauer M.J., Lo A., Prescher J.A., Bertozzi C.R.* // *Methods Enzymol.* 2006. V. 415. P. 230–250.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)15015-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)15015-6)
122. *Bertozzi C.R., Saxon E.* // *Science.* 2000. V. 287. P. 2007–2010.
<https://doi.org/10.1126/science.287.5460.2007>
123. *Saxon J.I.A., Saxon C.R.B.E.* // *Org. Lett.* 2000. V. 2. P. 2141–2143.
<https://doi.org/10.1021/ol006054v>
124. *Nilsson B.L., Kiessling L.L., Raines R.T.* // *Org. Lett.* 2000. V. 2. P. 1939–1941.
<https://doi.org/10.1021/ol0060174>
125. *Nilsson B.L., Kiessling L.L., Raines R.T.* // *Org. Lett.* 2001. V. 3. P. 9–12.
<https://doi.org/10.1021/ol006739v>
126. *Soellner M.B., Nilsson B.L., Raines R.T.* // *J. Org. Chem.* 2002. V. 67. P. 4993–4996.
<https://doi.org/10.1021/jo0256311>
127. *Hemmilä I.* // *J. Alloys Compd.* 1995. V. 225. P. 480–485.
[https://doi.org/10.1016/0925-8388\(94\)07069-5](https://doi.org/10.1016/0925-8388(94)07069-5)
128. *Brechbiel M.W., Gansow O.A.* // *Bioconjug. Chem.* 1991. V. 2. P. 187–194.
<https://doi.org/10.1021/bc00009a008>
129. *Пугачев Д.Е., Осин Н.С., Васильев Н.В.* // *Вест. Моск. гос. областного ун-та. Сер. Естест. науки.* 2017. № 3. С. 51–60.
<https://doi.org/10.18384/2310-7189-2017-3-51-60>
130. *Brechbiel M.W., McMurphy T.J., Gansow O.A.* // *Tetrahedron Lett.* 1993. V. 34. P. 3691–3694.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)79202-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)79202-1)

131. Xiao Y., Xue R., You T., Li X., Pei F., Wang X., Lei H. // Carbohydr. Res. 2014. V. 395. P. 9–14.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.05.022>
132. Nghia N.T., Tinet E., Ettori D., Beilvert A., Pavon-Djavid G., Maire M., Ou P., Tualle J.-M., Chaubet F.J. // Biomed. Opt. 2021. V. 22. P. 76004.
<https://doi.org/10.1117/1.jbo.22.7.076004>
133. Ute R.-G., Markus G., Sara C.-J., Roland N., Thomas N. // Nat. Methods. 2008. V. 5. P. 763.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1248>
134. Thanh N.T.K., Green L.A.W. // Nano Today. 2010. V. 5. P. 213–230.
<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2010.05.003>
135. Karakoti A.S., Shukla R., Shanker R., Singh S. // Adv. Colloid Interface Sci. 2015. V. 215. P. 28–45.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.11.004>
136. Zhang M., Bai L., Shang W., Xie W., Ma H., Fu Y., Fang D., Sun H., Fan L., Han M., Liu C., Yang S.J. // Mater. Chem. 2012. V. 22. P. 7461.
<https://doi.org/10.1039/c2jm16835a>
137. Yuan F., Li S., Fan Z., Meng X., Fan L., Yang S. // Nano Today. 2016. V. 11. P. 565–586.
<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.08.006>
138. Fan Z., Zhou S., Garcia C., Fan L., Zhou J. // Nanoscale. 2017. V. 9. P. 4928–4933.
<https://doi.org/10.1039/c7nr00888k>
139. Nelson S.R., Ali M.Y., Warshaw D.M. // Methods Mol. Biol. 2011. V. 778. P. 111–121.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-261-8_8
140. Zanchet D., Micheel C.M., Parak W.J., Gerion D., Alivisatos A.P. // Nano Lett. 2001. V. 1. P. 32–35.
<https://doi.org/10.1021/nl005508e>
141. Zheng Z., Pan X., Xu J., Wu Z., Zhang Y., Wang K. // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 163. P. 1403–1420.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.210>

Methods for Introducing Fluorescent Labels into Polysaccharides

A. Yu. Nokel^{*, **}, N. V. Bovin^{*, #}, A. B. Tuzikov^{*}, T. V. Ovchinnikova^{*}, and N. V. Shilova^{*, **}

[#] Phone: +7 (916) 474-93-82; e-mail: professorbovin@yandex.ru

^{*} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**} National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named
after Academician V.I. Kulakov of the Ministry of Health of Russian Federation,
ul. Oparina 4, Moscow, 117997 Russia

Polysaccharides are widely represented in plants and bacteria, where they are distinguished by their extraordinary structural diversity and the performance of various functions. To study the functions of polysaccharides, their fluorescent labeling is needed. This review discusses methods for introducing fluorescent labels into polysaccharides by chemical modification of certain functional groups of these complex biopolymers, as well as using the so-called bioorthogonal reactions, which allow labeling in a cell without affecting its viability. In addition to modification with organic dyes, the possibility of using quantum dots and coordination compounds of lanthanides is also discussed.

Keywords: polysaccharides, fluorescent label, lanthanides, quantum dots, bioorthogonal reactions



УДК 576.32/36+576.382

АРХИТЕКТОНИКА УБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ

© 2024 г. К. А. Иванова*, #, А. А. Белогуров*, #, А. А. Кудряева*

* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 04.12.2023 г.

После доработки 09.12.2023 г.

Принята к публикации 10.12.2023 г.

Убиквитинирование является одной из самых распространенных посттрансляционных модификаций белков, оказывающей значительное влияние на их функции, такие как стабильность, активность и клеточная локализация. Нарушения убиквитинирования и деубиквитинирования связаны с различными онкологическими и нейродегенеративными заболеваниями. Сложность убиквитиновых сигналов – моноубиквитинирование и полиубиквитинирование с разной длиной и различными типами связей между убиквитинами – определяет их универсальность и способность регулировать сотни клеточных процессов. Для глубинного понимания механизмов сборки и разборки, детектирования убиквитиновых цепей и передачи ими сигнала требуются новейшие биохимические, масс-спектрометрические и вычислительные методы. Последние научные достижения позволяют идентифицировать убиквитинирование белков и структуру цепей убиквитина, однако в этой области все еще остается немало вопросов. Настоящий обзор посвящен детальному анализу текущего понимания архитектуры убиквитиновых цепей.

Ключевые слова: убиквитин, полиубиквитин, убиквитиновые цепи, убиквитин-протеасомная система, убиквитинлигаза, деубиквитиназа

DOI: 10.31857/S0132342324040038, **EDN:** MXJASY

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	380
2. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ УБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ	380
3. ФУНКЦИИ УБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ	388
3.1. K6-цепи	388
3.2. K11-цепи	388
3.3. K27-цепи	389
3.4. K29-цепи	390
3.5. K33-цепи	390
3.6. K48-цепи	391
3.7. K63-цепи	391
4. ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПОЛИУБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ВЕТВЛЕНИЯ	392
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	393
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	393

Сокращения: Ub – убиквитин; APC/C – убиквитинлигаза; ЖХ – жидкостная хроматография; МС – масс-спектрометрия.

Автор для связи: (эл. почта: anna.kudriaeva@ibch.ru; alexey.belogurov.jr@gmail.com).

1. ВВЕДЕНИЕ

Убиквитин (Ub) – небольшой (~8 кДа) сигнальный белок, играющий центральную роль во многих клеточных процессах, включая деградацию белков [1, 2], активацию сигнальных путей и репарацию ДНК [3, 4]. Известно до 14 различных семейств убиквитина и убиквитин-подобных белков, различающихся по аминокислотной последовательности, но имеющих характерную пространственную структуру.

Убиквитин прикрепляется к белку-мишени с помощью последовательных действий представительного семейства ферментов. Ковалентное присоединение убиквитина к субстратам осуществляется при помощи системы, состоящей из трех ферментов: активирующей убиквитин E1-лигазы, конъюгирующей E2-лигазы и убиквитинлигазы E3. Существует множество способов модификации белков убиквитином, из которых выделяют моноубиквитинирование (одного или нескольких сайтов), а также полиубиквитинирование с разными параметрами связи и длинами убиквитиновых цепей. ε-Аминогруппы семи остатков лизина K6, K11, K27, K29, K33, K48 и K63, входящих в состав убиквитина, позволяют ему образовывать изопептидные связи между карбоксильной группой C-концевого остатка глицина одной молекулы убиквитина и аминогруппой другой молекулы убиквитина, которая, в свою очередь, связана с белком-субстратом посредством C-концевого остатка глицина G76 [5]. Параметры цепей крайне разнообразны: они могут быть как гомогенными или гомотипическими (т.е. образовывать связи через остатки лизинов в строго определенном положении), так и гетерогенными или гетеротипическими (комбинировать разные типы связей); последние, в свою очередь, могут разветвляться посредством убиквитинирования сразу по нескольким сайтам (разветвленные цепи) [6]. Считается, что значение сигнала убиквитинирования зависит от типа связи и длины убиквитиновой цепи. Так, классическое представление состоит в том, что цепи, образованные через остаток лизина K48, обычно маркируют белки, предназначенные для деградации в протеасоме, в то время как цепи, образованные связью через

остаток лизина K63, играют ключевую роль в координации процессов направленного эндоцитоза, воспаления, трансляции и репарации ДНК. Если физиологические функции были охарактеризованы для некоторых гомотипических убиквитиновых цепей [7], то гетеротипические цепи остаются практически неизученными. Существование и физиологическая роль большей части гетеротипических комбинаций – до сих пор открытый вопрос. В основном это связано с тем, что на несмотря на довольно широкий репертуар методов, используемых для изучения убиквитиновых цепей [7], ввиду большой сложности объекта исследования очень затруднительно корректно интерпретировать получаемые результаты.

В данном обзоре рассмотрены используемые в настоящий момент методы изучения убиквитиновых цепей, их характеристики и ограничения, а также особенности функционирования как описанных, так и пока мало изученных гомо- и гетеротипических цепей.

2. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ УБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ

Традиционно убиквитинирование белков – процесс, важный для регуляции клеточных функций, – исследовали биохимическими методами, в первую очередь, используя иммуноблоттинг с антителами к убиквитину. Этот метод наиболее распространен для обнаружения и подтверждения убиквитинирования отдельных белков. Однако иммуноблоттинг – аналитически сложный метод, что ограничивает его применимость для полного профилирования убиквитинирования белков. С развитием масс-спектрометрических подходов все чаще используются протеомные методы для профилирования убиквитинирования. Для повышения чувствительности идентификации убиквитинированных белков осуществляют их обогащение из лизатов клеток. Для этого присоединяют к убиквитину различные эпитопные (Flag, HA, V5, Myc, Strep и His) или белковые метки (GST, MBP, SUMO, CBP, Halo, NusA и FATT) (рис. 1) [8]. С помощью этого метода было обнаружено значительное число сайтов убиквитинирования на различных субстратах [9, 10].

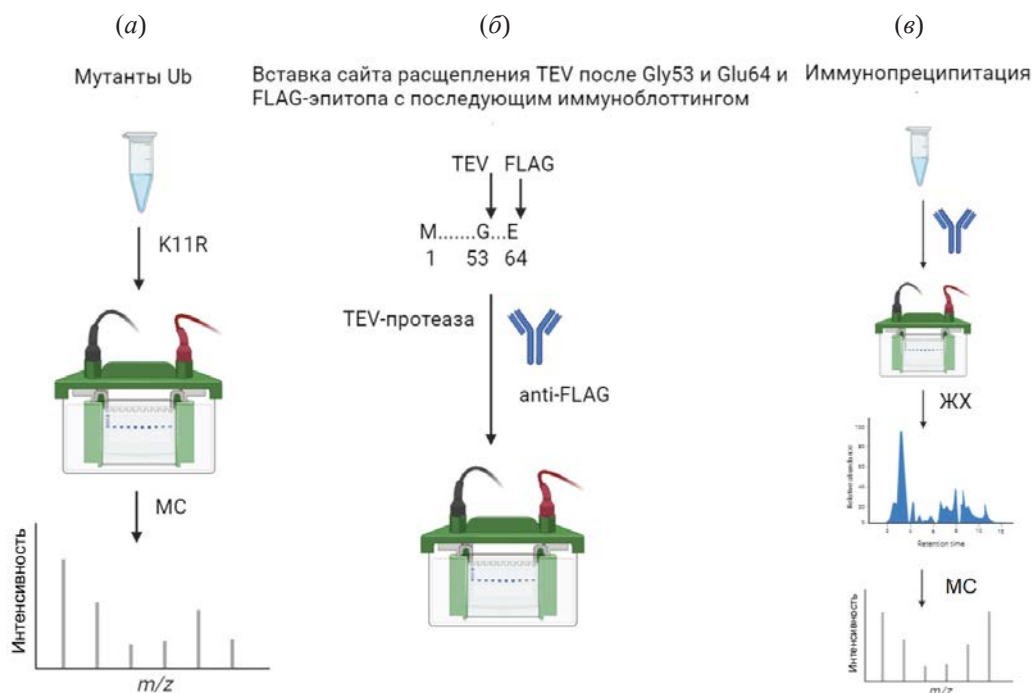


Рис. 1. (a) – В данной методике используется введение мутаций в убиквитин с последующим нанесением на ПААГ и масс-спектрометрией для выявления образования разветвленных цепей (табл. 1); (б) – представлен вариант обнаружения убиквитиновых цепей при помощи присоединенных эпитопной метки и сайта расщепления с последующей обработкой протеазой и иммуноблоттингом (табл. 1); (в) – показана схема метода иммунопреципитации, в котором присутствие разветвленных цепей детектируется последовательным иммуноблоттингом, ЖХ и МС (табл. 1).

Несмотря на то что данный подход довольно прост и удобен, он имеет довольно низкую эффективность и высокий уровень “шума”, поэтому большее внимание привлекают подходы, позволяющие обогащать эндогенные убиквитинированные белки.

Для профилирования эндогенно убиквитинированных субстратов было разработано несколько типов антител к убиквитину, способных распознавать все типы связей [11]. Помимо антител к тотальному убиквитину используют антитела, специфичные к определенным типам связей (M1/K11/K27/K48/K63) [12]. Этот подход успешно применяется для характеристики убиквитинирования белков из тканей животных или клинических образцов без необходимости генетических манипуляций.

Помимо антител используются белки, содержащие убиквитин-связывающие домены, которые

распознают убиквитин, что также может быть использовано для связывания и обогащения эндогенно убиквитинированных белков [13, 14] (рис. 2, табл. 1). Тандемно повторяющиеся убиквитин-связывающие домены (TUBEs) продемонстрировали значительно более высокую аффинность (наномолярные концентрации), чем одиночные домены [14, 15]. Были разработаны TUBEs для специфических связей K63, K48 и M1 [15, 16].

Кроме того, используются методы, включающие в себя введение радиоактивных изотопов для отслеживания образования разветвленных цепей (рис. 3) (табл. 1).

Важно отметить, что убиквитинирование можно изучать и при помощи баз данных, таких как SCUD и UbiProt [17].

Цепи убиквитина с различной топологией регулируют стабильность белка, белок-белковое

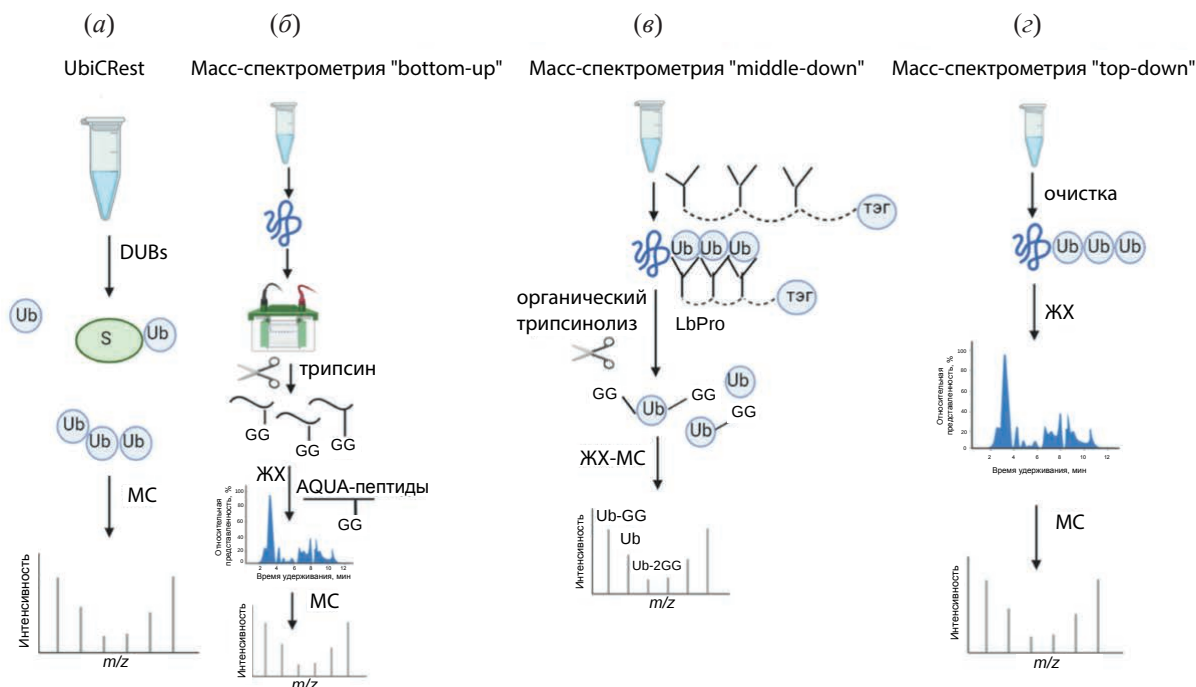


Рис. 2. (а) – В данной методике к образцу с субстратом добавляют деубиквитиназы, в результате чего происходит отщепление убиквитиновых цепей от субстрата с последующей их визуализацией методом масс-спектрометрии; (б–д) – представлены варианты масс-спектрометрических подходов, в которых использовано расщепление трипсином (б, в) и разделение убиквитиновых цепей в зависимости от их способа ветвления (б–д) (табл. 1). Частично заимствовано из работ [19], [82], [90–94].

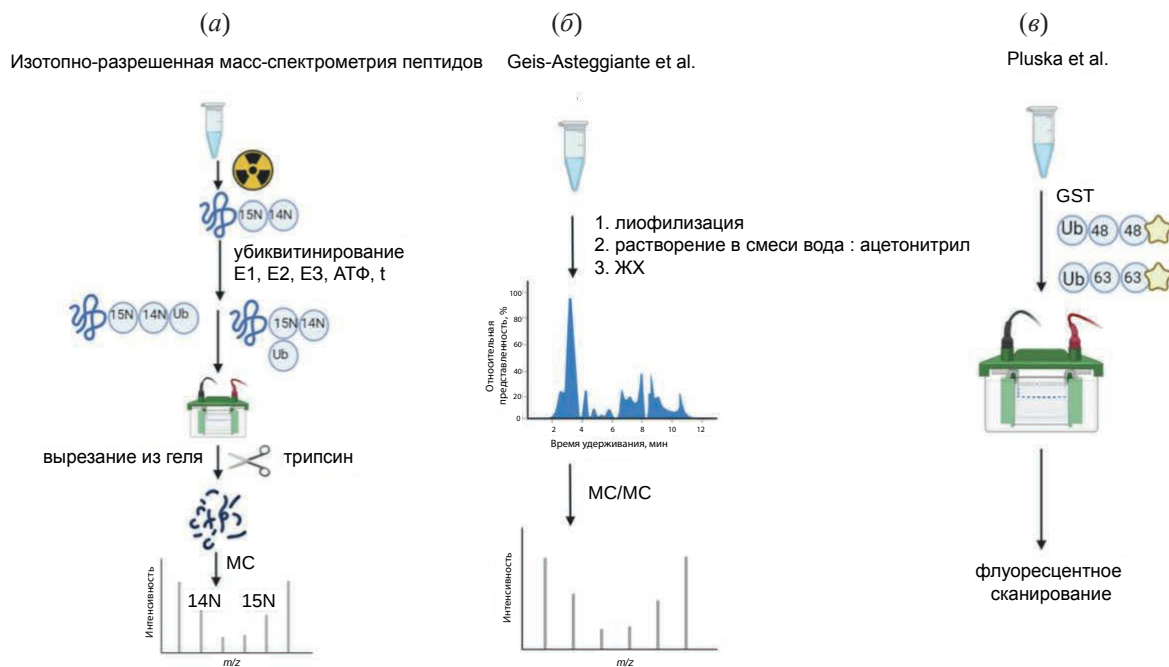


Рис. 3. (а) – В данной методике происходит убиквитинирование радиоактивно меченым убиквитином с последующим нанесением на ПААГ, вырезанием из геля, обработкой трипсином и разделением на масс-спектрометрии в соответствии с изотопным составом; (б) – представлена комбинация методов ЖХ и tandem-масс-спектрометрии, в результате которой становится возможной идентификация убиквитиновых цепей; (в) – в этом случае к флуоресцентно меченым убиквитиновым цепям присоединяется белковая метка GST, впоследствии пробу наносят на ПААГ и выявляют флуоресцентным сканированием (табл. 1). Частично заимствовано из работы [95].

взаимодействие или локализацию белка в эукариотических клетках и, таким образом, играют важную роль в многофункциональных сигналах [18]. Рассмотренные выше подходы в основном обнаруживают убиквитинированные субстраты и сайты убиквитинирования, но не способны определить архитектуру цепей. Существует несколько возможностей детекции архитектуры цепей, например, для идентификации различных топологий используют специфические антитела или TUBEs [8].

Важное значение для определения параметров круговорота Ub имеет работа Kudriaeva et al. (2021) (рис. 4) [7]. В ней авторы использовали лентивирусные конструкции, обеспечивающие синхронную экспрессию ZsGreen и модифицированной липоатлигазы LpIA (AAG), конъюгирующей к ϵ -аминогруппе лизина в составе LAP пептида флуорофор резорурфин. В результате анализа флуоресценции клеток HEK293T, экспрессирующих LAP-Ub и ZsGreen-LpIA (AAG), было установлено, что время полужизни убиквитина

в клетках млекопитающих составляет $\tau_{1/2} \sim 4$ ч. Динамическое равновесие между процессами убиквитинирования и деубиквитинирования соответствовало 6–7 молекулам Ub на субстрат. Отношение флуоресценции ZsGreen и резорурфина позволило определить стабильность вариантов Ub. Так, стабильность снижалась в ряду $WT > R27K > R29K > R33K > R6K > R11K > R63K > R48K > UbK0^{VV}$. Профилирование стабильности вариантов Ub методом FACS выявило, что аминокислотный остаток K27 обеспечивает стабильность всей молекулы Ub. Анализ полученных данных показал, что только каждый четвертый захват полиубиквитинового субстрата приводит к потере одной молекулы убиквитина из состава всей цепи, и что каждая молекула Ub принимает участие в среднем в 16 циклах конъюгации, каждые 15 мин включаясь в новые цепи.

Подробное описание методов, позволяющих изучать гетеротипические цепи, представлено в табл. 1.

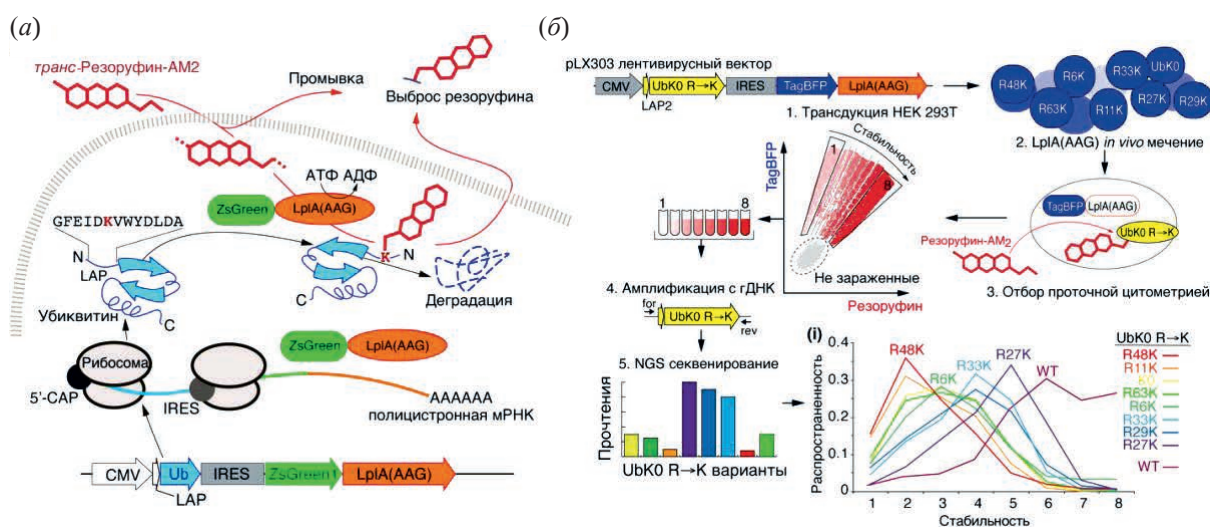


Рис. 4. (а) – Схема методики PRIME, примененной в работе Kudriaeva et al. [7]. Показана синхронная экспрессия резорурфин-лигазы и белка интереса, а также обработка клеток резорурфином; (б) – схема профилирования стабильности убиквитина у млекопитающих [7]. Стабильные линии клеток HEK293T с одновременной экспрессией вариантов LAP-UbK0 с заменой R на K и TagBFP-LpIA(AAG), смешанные в равном соотношении, обрабатывали резорурфином, инкубировали с DMSO или ингибитором протеасомы в течение 2 ч и далее фракционировали с применением проточной цитометрии. Фракции клеток с разным соотношением флуоресценции TagBFP и резорурфина подвергали ПЦР для амплификации геномного кластера, кодирующего соответствующий вариант убиквитина, и далее NGS-секвенированию. Показан график зависимости распространенности вариантов убиквитина от их стабильности. Сокращения: гДНК – геномная ДНК.

Таблица 1. Методы изучения разветвленных цепей

Метод	Достоинства	Недостатки	Ссылки
Вставка сайта расщепления TEV после Gly53, Glu64 и FLAG-эпитопа с последующим иммуноблоттингом	– Позволяет отслеживать образование разветвленных убиквитиновых цепей <i>in vivo</i>, в отличие от масс-спектрометрии – Выявлено, что APC/C, Ube2C и Ube2S присоединяют к субстратам разветвленные цепи	– Изменение поверхностных свойств белка и нарушение его способности формировать цепи – Только качественная идентификация – Возможны артефакты	[19, 20]
Масс-спектрометрия “bottom-up” Варианты: 1) обработка трипсином с последующей ЖХ-МС 2) к лизатам клеток добавляли антитела, специфичные к определенным связям между убиквитином, (иммунопреципитация), затем наносили на гель-электрофорез и окрашивали по Кумасси, далее вырезали фрагменты и обрабатывали трипсином, затем МС 3) аффинная хроматография, обработка трипсином, затем МС 4) иммунопреципитация, обработка трипсином и МС-МС 5) нанесение на гель-электрофорез, обработка трипсином, затем Ub-AQUA (изотопно меченые распознаваемые пептиды (signature peptides (AQUA peptides)) для восьми типов связей добавляются к образцам в качестве внутренних стандартов), ЖХ-МС, мониторинг параллельных реакций (parallel reaction monitoring (PRM)) 6) мутация R54A, нанесение на гель-электрофорез, обработка трипсином, затем Ub-AQUA (изотопно меченые распознаваемые пептиды (signature peptides (AQUA peptides)) для восьми типов связей добавляются к образцам в качестве внутренних стандартов), ЖХ-МС, PRM 7) + TR-TUBE, обработка трипсином, Ub-AQUA/PRM	– Были обнаружены цепи K6/K11, K27/K29, K29/K33 и K48/K63 (после модификации Ub с мутацией Arg54) – К преимуществам тела относятся эффективная денатурация белков, удаление несовместимых с МС солей и хаотропов – Возможно обнаружение разветвленных K48/K63-цепей и отделение их от K48- и K63-цепей – Позволяет одновременно детектировать все восемь типов связей и определять их стехиометрию – Достоинства PRM: высокая чувствительность и точность – Позволяет избежать неспецифической адсорбции гидрофобных пептидов – Можно определить K48/K63-, K48- и K63-цепи	– Не позволяет выявлять цепи с аминокислотными остатками лизина, расположенными непосредственно, по причине ферментативного гидролиза и исчезновения разветвленного пептида – Неточное вырезание из геля может приводить к ошибкам (введение небольшого количества Ub из других дорожек) – Невозможно детектировать разветвленные цепи кроме тех, в которых ветви расположены на соседних лизинах (K6/K11, K11/K27 и K27/K29) – Не удается определить K48/K63-цепи из-за R54A – Адсорбция образцов из-за высокой гидрофобности разветвленных K48/K63- и K63-цепей – Метод фокусируется на составе связей и не позволяет определить архитектуру высокого порядка: для регистрации остальных разветвленных полимеров (кроме K48/K63) необходимо ввести еще больше мутаций, что приведет к увеличению размеров полимера и затруднит идентификацию [21, 22]	[9, 23–26]

Таблица 1. (Продолжение)

Метод	Достоинства	Недостатки	Ссылки
UbiCRest Варианты: 1) обработка деубиквитиновой Travid 2) предварительная иммунопреципитация cIAP1, затем добавление деубиквитиназ: сконструированных K48-специфичной OTUB1* и K63-специфичной AMSH*, а также rap-DUB Usp2сс, затем MC	– Позволяет выяснять порядок образования связей на цепях – Гидролиз связей K29 доказал их присутствие – Обнаружено, что K63-цепи расположены proximally к cIAP1, и на их основе происходит конъюгация с K11- и K48-цепями – Обнаружено, что K48-цепи – самые дистальные	– Требуется оптимизация эксперимента, позволяет обнаружить ограниченное количество вариантов цепей [27] – Ограничение способа заключается в том, что полимеры могут изменить структуру после добавления деубиквитиназ [19]	[23, 28, 29]
Иммунопреципитация Варианты: 1) + PRM 2) иммунопреципитация белка cIAP1, активированного LCL-161, далее ЖХ-МС, затем PRM 3) + K11/K48-специфичное антитело + убиквитин-специфичная пептидаза 2 (USP2) 4) поверхностный плазмонный резонанс (SPR) + K11/K48 биспецифичное антитело, иммуоблоттинг + убиквитинлигаза APC/C, убиквитин-конъюгирующие ферменты UBE2C, UBE2S	– Подтверждено, что K48-цепи собирает CRL2^{VHL} – Выявлено, что к cIAP1 прикреплены K11-, K48- и K63-цепи – Показано, что после ингибирования протеасомы белок C9orf72 модифицируется K11/K48-цепями – Обнаружено, что после добавления деубиквитиновой K11/K48-цепи отщепляются – Антитела продемонстрировали более высокую аффинность к разветвленным K11/K48-цепям, чем к гомотипическим – Выяснено, что APC/C собирает K11/K48-цепи <i>in vitro</i>	– Низкий выход и кросс-специфичность антител – Получаются смеси убиквитиновой и конъюгатов убиквитиновой, с низкой эффективностью разделяемые обращенно-фазовой ЖХ	[28–32]

Таблица 1. (Продолжение)

Метод	Достоинства	Недостатки	Ссылки
Ub-clipping (масс-спектрометрия “middle-down”) Варианты: 1) + TUBE, потом + протеаза Lbpro, затем растворение трипсином в геле, далее AQUA MS 2) синтез стандартов K48/K63, K11/K63 и K11/K48 3) обработка трипсином, MS, диссоциация при переносе электронов (electron transfer dissociation (ETD))	– Упрощенное определение структуры за счет C-концевого мотива GG – Подтверждено, что убиквитинлигаза TRIP12 рекрутируется к белку BRD4 посредством комплекса CRL2 ^{VHL} и добавляет гетеротипические K29-связи, что способствует ветвлению при помощи K48-связей с участием CRL2 ^{VHL} – Обнаружено, что K11- и K48-цепи конъюгированы с K63-связанными цепями (самыми проксимальными), и разветвленные цепи включают связи K11/K48, K48/K63 и, возможно, K11/K63 – Возможно определить ветвление цепей – Выяснено, что убиквитинлигаза NleL создает K6/K48-разветвления, убиквитин-конъюгирующие ферменты UBE2S и UBE2R1 образуют K11/K48-ветви, убиквитин-конъюгирующие ферменты UBE2N/UBE2V2 с UBE2R1 формируют K48/K63-бифуркации	Не позволяет определить разветвленный Ub [1]	[26–29, 33]
Масс-спектрометрия “top-down” ЖК-МС, ETD, ProSight Lite, кислотный гидролиз при помощи микроволн (micro-wave-supported acid cleavage)	Возможно точное определение архитектуры разветвленных цепей	Требуется оптимизация метода [34]	[26, 35]
Изотопно-разрешенная масс-спектрометрия пептидов Этапы: 1) добавление субстратов diUb, затем убиквитинирование K48-цепями, нанесение на денатурирующий гель-электрофорез, далее визуализация 2) мечение проксимального убиквитина ¹⁵ N и дистального ¹⁴ N, убиквитинирование, SDS-PAGE, вырезание из геля, обработка трипсином, MS	– Не требует флуоресцентных меток или замен в ферментах или субстратах, не вызывает возмущений в биологической системе во время эксперимента – Позволяет определить, как синтезируются цепи и с какой скоростью – Выявлено, что предпочтительный субстрат для E2-25K – цепи K63-diUb – Выяснено, что предпочтительнее образуются разветвленные K48/K63-цепи, смешанные K29/K48-цепи и одинаковые количества разветвленных и смешанных K27/K48-цепей	Невозможно разделить смешанные или разветвленные цепи	[1]

Таблица 1. (Продолжение)

Метод	Достоинства	Недостатки	Ссылки
UbiChEM-MS – 1-й вариант Этапы: 1) + TUBE/NZF1, минимальный трипсинолиз, обращенно-фазовая ЖХ, MS 2) + ингибитор протеасомы MG132, + тандемные убиквитин-связывающие домены (TUBE) 3) + ингибитор протеасомы MG132, + белок NZF1 4) ETD 5) UbiCRest, + деубиквитиная TRABID, + деубиквитиная OTUB1, + деубиквитиная USP15, WB	– Позволяет обнаруживать цепи, которые не идентифицируются масс-спектрометрией “bottom-up”, и отслеживать их динамику – Возможна идентификация ветвления эндогенных цепей – Разделяет линейные и разветвленные цепи – Использует DUB с разной селективностью для определения архитектуры цепей – Добавление TUBE позволяет выделить цепи с высокой молекулярной массой. Выявлено, что 57% of Ub₁₋₇₄ существует в виде моноUb, 41% – GGUb₁₋₇₄, 2% – 2×GGUb₁₋₇₄ – Разветвленные цепи накапливаются, а значит, участвуют в протеасомной деградации – Выявлено, что цепи, обогащенные NZF-доменом, не участвуют в протеасомной деградации – Выявлены остатки Gly-Gly на K29- и K48-цепях – Обнаружено, что NZF1-обогащенные цепи содержат K29- и K48-связи	–	[36]
UbiChEM-MS – 2-й вариант + связь-специфичные антитела к K11, WB, минимальный трипсинолиз, масс-спектрометрия “middle-down” высокого разрешения, ETD-фрагментация	– Показано, что в асинхронно растущих клетках HEK293 содержится 72–78% Ub₁₋₇₄, 21–26% GGUb₁₋₇₄, ~1% 2×GGUb₁₋₇₄ – Обнаружено, что разветвленные цепи накапливаются после остановки митоза – Выявлено, что цепи K11/K48 образуются циклозависимо	–	[2]
Микроскопический термофорез	– Показано, что UCH37(C88S)–RPN13C имеет самую высокую аффинность к [Ub]_{2-6,48}Ub	Невозможно измерить белок-белковые взаимодействия [37]	[38]
ЖХ, тандемная масс-спектрометрия	Возможно прямое и эффективное определение конъюгатов убиквитина и убиквитиновых цепей	Возможны “изобарные” интерференции, “эффект супрессии иона” [39]	[30]

Таблица 1. (Окончание)

Метод	Достоинства	Недостатки	Ссылки
Мутанты Ub Варианты: 1) мутанты Ub (K11R), ubi^{K11}, масс-спектрометрия 2) мутанты K48R, R42A, + белок Ubc1	– Выявлено, что в присутствии мутантных форм убиквитинирования киназы Nek2A с помощью Ube2S не происходит – Обнаружено, что убиквитин-конъюгирующий фермент Ube2S образует разветвленные цепи – Показано, что APC/C прикрепляет связи K11, K48 и K63 к Nek2A – Установлено, что UBA-домен Ubc1 связывается с дистальным фрагментом K63-Ub₂, чтобы совместить UBC-домен с проксимальным Ub, тем самым способствуя образованию разветвленных цепей K48/K63	Применение ограничено системами <i>in vitro</i> [3]	[20, 40]
Добавление GST-слизанных белков к флуоресцентно-меченым K48- и K63-цепям, SDS-PAGE, флуоресцентное сканирование Примечание: UbiCRest – рестрикция убиквитиновых цепей (Ubiquitin Chain Restriction); UbiChEM-MS – масс-спектрометрия убиквитиновых цепей (Ubiquitin Chain Enrichment Middle-down Mass Spectrometry).	Показано, что K63-цепи связываются сильнее с UBA-доменом Ubc1	Фотообесцвечивание и аутофлуоресценция	[4]

3. ФУНКЦИИ УБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ

3.1. K6-цепи

Известно, что цепи K6 (рис. 5) регулируют митофагию [28, 41–43].

Интересно, что на лишенных природного убиквитина клетках U2OS, в которые был введен экзогенный убиквитин, было показано, что у популяций клеток с заменой на аргинин K6 или K63 наблюдается задержка митофагии. Кроме того, методом протеомики AQUA рассчитано, что во время деполяризации митохондрий происходит шестикратное увеличение содержания K6-, K11-, K48- и K63-связанных полиубиквитинов, образованных при участии убиквитинлигазы Parkin. Деубиквитиназа USP30 избирательно удаляет цепи K6 и K11 с белков внешней мембраны митохондрий. Другой аналогичный фермент, USP8, удаляет полиубиквитины, связанные через K6, с Parkin, и препятствует аутоубиквитинированию Parkin, что говорит о роли данных форм убиквитина в контроле качества митохондрий [42]. Помимо этого выявлено, что численность K6-связанных цепей не растет при ингибировании протеасомы [44, 45]. Считается, что полимеры с данным типом связи участвуют в репарации ДНК, осуществляемой при помощи фермента E3 BRCA1–BARD1. Под воздействием УФ-лучей содержание K6- и K33-связанных цепей возрастает [46].

3.2. K11-цепи

Цепи K11 (рис. 6) способствуют протеасомному гидролизу субстратов и завершению митоза [23, 47]. Так, количество подобных полиубиквитинов возрастает во время деятельности убиквитинлигазы APC/C в течение митоза [48]. Также цепи K11 регулируют прогрессию клеточного цикла, способствуя деградации его медиаторов [49]. K11-цепи не только регулируют прохождение клеточного цикла, но и участвуют в клеточном ответе на гипоксию [47]. Функция данных форм во врожденном иммунитете иллюстрируется деградацией факторов, ответственных за это явление [50]. Так, белок STING под действием присоединенных K11-цепей продолжает функцио-

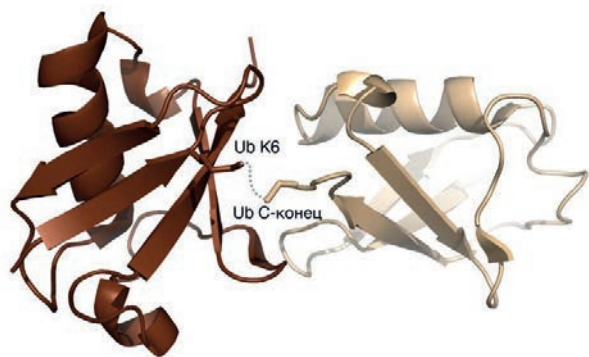


Рис. 5. Кристаллическая структура K6-связанного диубиквитина как пример гомотипических цепей K6 (PDB: 2XK5). Показана изопептидная связь между остатком K6 проксимального убиквитина и C-концом аксиального.

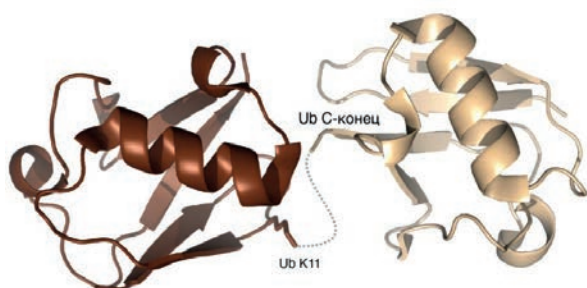


Рис. 6. Кристаллическая структура K11-связанного диубиквитина как пример гомотипических цепей K11 (PDB: 2MBQ). Показана изопептидная связь между остатком K11 аксиального убиквитина и C-концом проксимального.

нировать в клетке [50]. После этого запускается активация интерферонов I типа и провоспалительных цитокинов [51]. Считается, что убиквитинлигаза RNF26, прикрепляющая к субстратам K11-полиубиквитины, регулирует метаболизм интерферонов I типа, и что данный процесс протекает времязависимо [50]. Кроме того, известно, что K11- и K48-формы, модифицирующие белок Beclin-1, регулируют протеолиз [52]. Более того, убиквитинирование данного белка K11-цепями противодействует аутофагии и способствует реакции интерферонов I типа после гидролиза белка Beclin-1.

3.3. K27-цепи

Методом масс-спектрометрии с множественным мониторингом реакций обнаружено, что

K27-связанные конъюгаты (рис. 7) присоединяются к гистону H2A, и что данная разновидность цепей преобладает на хроматине во время повреждения ДНК [47, 53].

Благодаря гомотипическим цепям K27 к месту повреждения ДНК направляются такие белки репарации, как 53BP1, Rap80, RNF169 и RNF168 [53]. Аналогично отсутствие K27-соединенных полиубиквитинов на гистонах H2A и H2A.X препятствует ответу на повреждение ДНК, поскольку его медиаторы (53BP1, Rap80, RNF168 и RNF169) не получают убиквитиновый сигнал для начала ответной реакции [53]. Кроме того, убиквитинирование TRIM23 вышеупомянутыми цепями приводит к повышению активности TBK1 и, в свою очередь, к фосфорилированию p62 и аутофагии при появлении в клетке вирусных ДНК и РНК [54]. Любопытно, что аналогичный фермент TRIM26 тоже модифицируется вышеуказанными цепями при запуске сигнального пути RLR и после фосфорилирования данной убиквитинлигазы при помощи TBK1 [50]. Впоследствии белок NEMO связывается с K27-полимерами на убиквитинлигазе TRIM26, что повышает экспрессию провоспалительных цитокинов, интерферонов I типа и интерферон-стимулированных генов (ISGs) [5]. Опубликованы данные об участии подобных полимеров в иммунном ответе на экзогенную ДНК микроорганизмов [55]. Так, STING подвергается убиквитинированию K27-связанными формами при помощи белка

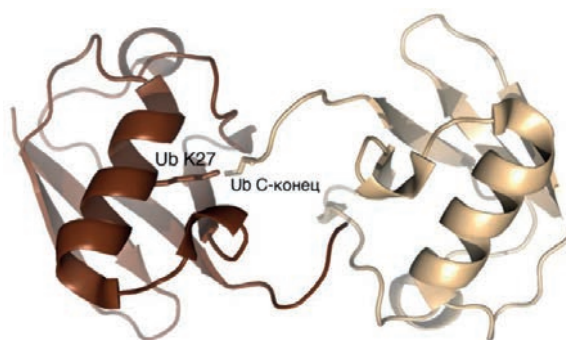


Рис. 7. Кристаллическая структура K27-связанного диубиквитина (PDB: 5J8P) как пример гомотипических цепей K27. Показаны остаток K27 аксиального убиквитина и C-конец проксимального.

AMFR, что повышает активность серин-треониновой протеинкиназы TBK1, что, в свою очередь, дает возможность фактору транскрипции IRF-3 фосфорилироваться и запустить экспрессию интерферонов I типа [55]. Появились сообщения и о том, что присоединение K27-цепей к NEMO активирует каскад RLR, транскрипционный фактор NF- κ B и IRF3 [6]. Предполагается, что белки, ответственные за врожденный иммунитет, такие как Rbddd3, прикрепляются к полиубиквитинам на белке NEMO [7]. После этого K27-полимеры образуются на Rbddd3, и к ним приближается деубиквитиназа A20, которая расщепляет цепи K63 на NEMO, что ослабляет сигналинг NF- κ B [7]. Таким образом, Rbddd3 регулирует деятельность дендритных клеток и препятствует развитию Th17-клеточного колита на мышинной модели [8]. Обнаружено, что благодаря убиквитинлигазе TRIM40 происходит убиквитинирование цепями K27 и K48 рецептора опознавания паттерна RIG-I и RIG-I-подобного рецептора MDA5, что приводит к протеолизу данных субстратов [56]. Также выяснено, что к белку MAVS присоединяются цепи K27 при участии убиквитинлигазы TRIM21 [57, 58]. Аналогичную функцию выполняет E3-фермент MARCH8 [59]. Сходным действием обладает и убиквитинлигаза RNF34, убиквитинирующая MAVS цепями K27 и K29 [60]. Известно, что K27-полиубиквитиновые цепи задействованы в реакции иммунной системы на ДНК-вирусы или бактерии рода *Listeria* [61, 62]. Описано и совместное действие гомотипических цепей в клетке. Так, предполагается, что K27- и K63-формы запускают каскад TAK1 [10]. Установлено, что K27- и K33-цепи участвуют в реакции на стресс [63].

3.4. K29-цепи

Цепи K29 (рис. 8) участвуют в протеолитической деградации [23].

Выявлено, что гомотипические цепи K29 представляют собой наиболее многочисленный вид полимеров с нестандартной архитектурой [64–66]. Например, есть данные о том, что убиквитинлигаза Smurf1 присоединяет гомотипические K29-цепи к белку Axin [11]. Подобная посттрансляционная модификация препятствует связыванию Axin с

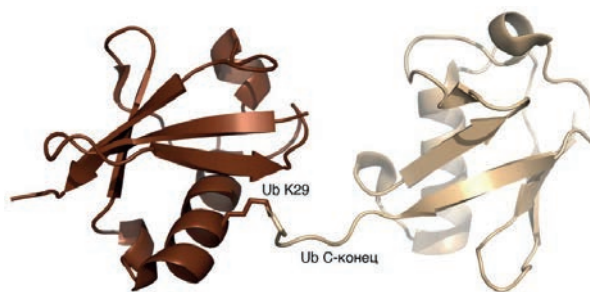


Рис. 8. Кристаллическая структура K29-связанного диубиквитина (PDB: 4S22) как пример гомотипических цепей K29. Показаны остаток K29 аксиального убиквитина и C-конец проксимального.

коррецепторами Wnt LRP5 и LRP6 (LRP5/6), что нарушает присоединение фосфатов к LRP6 и способствует подавлению каскада Wnt/ β -катенин [67]. Кроме того, известно, что деубиквитиназа Trubid, ассоциированная с сигналингом выше, отщепляет полиубиквитиновые цепи с K29- и K33-связями [65, 68–71]. Считается, что данная E3 осуществляет взаимодействие и отщепляет убиквитиновые цепи с APC [72]. Синтез гомотипических цепей K29 и K48 осуществляется при помощи фермента E3 UBE3c/Hul5 [73]. Отщепление первых цепей происходит благодаря домену OTU деубиквитиназы TRABID [74]. Имеются данные о том, что убиквитинлигаза TRIP12 в одиночку формирует K29-связанные убиквитиновые цепи [28]. Это было подтверждено методом замены лизина на аргинин в мутантных формах убиквитина [28].

3.5. K33-цепи

Поскольку данные цепи (рис. 9) не накапливаются при нарушении работы протеасомы, считается, что они влияют на независимую от протеолиза деятельность клетки [25].

Синтез K11- и K33-цепей происходит при участии убиквитинлигазы AREL1 [64, 65]. Предполагается, что убиквитинирование данным ферментом белков, способствующих программируемой клеточной гибели (SMAC, HtrA2 и ARTS), предотвращает данный процесс [75]. Обнаружено, что K33-полиубиквитиновые цепи ингибируют работу T-клеточного рецептора (TCR) и AMPK-родственных протеинкиназ [12, 13]. Также

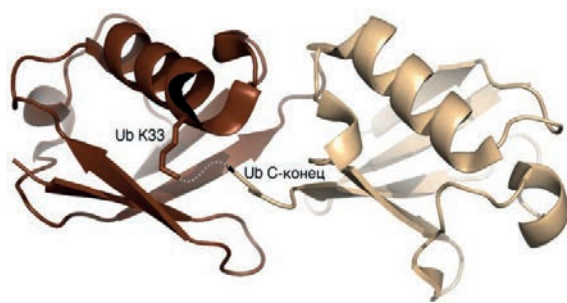


Рис. 9. Кристаллическая структура K33-связанного ди-убиквитина (PDB: 4XYZ) как пример гомотипических цепей K33. Показана изопептидная связь между остатком K33 аксиального убиквитина и C-концом проксимального.

имеются сведения об участии подобных форм в транспорте белков после аппарата Гольджи [76]. Ранее считалось, что K63-цепи принимают участие в секреции и эндоцитозе, способствуя сортировке белков мембраны [47]. Теперь выяснено, что фермент E3 Cul3–KLHL20 добавляет K33-формы к коронину-7 (Crm7) [47]. Полученный конъюгат взаимодействует с белком Eps15, что направляет его в *транс*-Гольджи на связывание с F-актином и подавляет его деполимеризацию [47].

3.6. K48-цепи

Считается, что чаще всего встречается именно этот тип цепей (рис. 10), отвечающих за направление на деградацию белков протеасомой [23, 77].

Выявлено, что K48- и K63-полиубиквитины контролируют врожденный иммунитет против

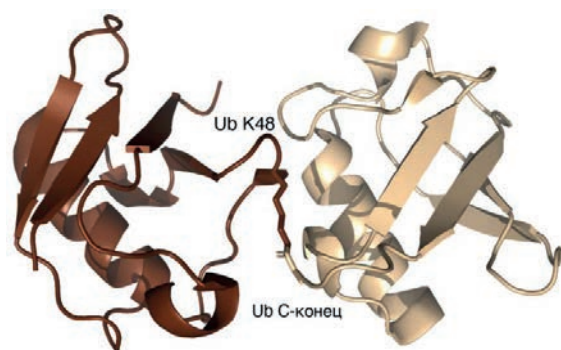


Рис. 10. Кристаллическая структура K48-связанного диубиквитина (PDB: 3AUL) как пример гомотипических цепей K48. Показаны остаток K48 аксиального убиквитина и C-конец проксимального.

вирусных инфекций [50]. Методом иммуно-преципитации определено, что с белком BRD4 в присутствии PROTAC MZ1 преимущественно связываются K48-цепи [14].

Циклические формы K48-цепей образуются при участии убиквитин-конъюгирующего фермента E2-25K [78]. Несмотря на конформационные ограничения, подобные цепи могут взаимодействовать с рядом белков [78]. Выявлено, что сложнее гидролизовать деубиквитиназой циклический диубиквитин, чем линейный [78]. По-видимому, при связывании с ферментом OTUB1 у циклического диубиквитина происходит трансформация конформации в более открытую форму, и они начинают взаимодействовать не только 144-патчами, но и соседними участками [78]. Предположительно, рост злокачественных опухолей ассоциирован с транскрипционным фактором p53, к которому прикрепляются цепи K48 [63].

3.7. K63-цепи

K63-формы (рис. 11) содействуют аутофагии, митофагии и утилизации патогенов [77].

Вышеупомянутые полимеры также влияют на круговорот белков, эндоцитоз, сборку сигнальных комплексов, репарацию ДНК, иммунный ответ и активность киназ [23, 49, 79–81]. Предполагается, что цепи подобного строения принимают участие в митозе, образовании мРНК, проверке правильности структуры белков и в различных каскадах [32, 82, 83]. Появились свидетельства того, что K63-полиубиквитины взаимодействуют с комплексом ESCRT0 и его составляющими, белками STAM и

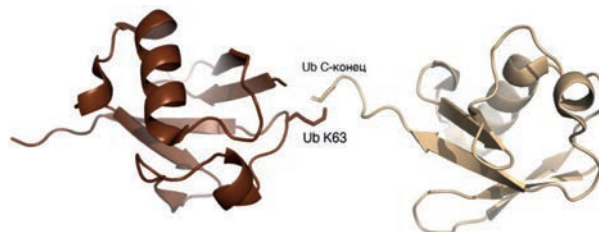


Рис. 11. Кристаллическая структура K63-связанного диубиквитина (PDB: 2JF5) как пример гомотипических цепей K63. Показаны остаток K63 аксиального убиквитина и C-конец проксимального.

Hrs [15]. После разрушения структуры на обеих цепях ДНК фермент E3 RNF8, формирующий K63-полимеры на гистоне H1 и белке L3MBTL2, привлекает к месту повреждения белки репарации, такие как 53BP1 и BRCA1 [84, 85]. Таким образом, функционирование убиквитинлигаз RNF8 и RNF168 приводит к убиквитинированию K63-, K48- и K27-цепями областей хроматина с двухцепочечными разрывами ДНК [16, 17]. Выявлено, что специфичность убиквитинлигазы к связям K48 и K63 определяется типом аминокислоты на С-конце НЕСТ-домена [86]. Отмечено, что в отличие от E3, присоединяющих K48- или K63-цепи, на С-конце убиквитинлигазы TRIP12 находится серин [28]. Обнаружено, что присоединенный валин на С-конце данной убиквитинлигазы меняет селективность на K48-цепи [28].

4. ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПОЛИУБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ВЕТВЛЕНИЯ

Согласно последним данным, разветвленные цепи (рис. 12) составляют 5–20% всех убиквитиновых цепей в клетке [18, 19]. Кроме того, известно, что представленность разветвленных цепей изменяется, реагируя на различные стимулы; например, инфицирование бактериями влияет на содержание разветвленных K6/K48-цепей, образованных при участии NleL [87, 88]. Считается, что M1/K63-цепи ответственны за активацию NF-κB [32]. Разветвленные цепи K48/K63 участвуют в сигналинге NF-κB и собираются адаптерным белком TRAF6 и убиквитинлигазой

HUWE1 IL-1β-зависимо [20]. Также они задействованы в каскадах апоптоза [28] и протеасомной деградации [29]. Цепи K29/K48 ускоряют PROTAC-направленную деградацию субстратов и участвуют в протеасомном гидролизе [28, 29]. Кроме того, они контролируют ЭПР-ассоциированную деградацию (ERAD) у млекопитающих и убиквитин-зависимую деградацию (Ub fusion degradation) у дрожжей [28]. Сборка данных цепей осуществляется при помощи убиквитинлигазы TRIP12 и комплекса CRL2^{VHL} [28]. K11/K48-цепи направляют на деградацию субстраты, участвующие в клеточном цикле, экспрессии генов и контроле качества белков, регулируют митоз (при формировании APC/C) [14, 21]. Смешанные цепи K11/K48, вероятно, регулируют репарацию двухцепочечных разрывов ДНК [22]. Выявлено, что белок C9orf72 – субстрат K11/K48-убиквитинирования [31]. Обнаружено, что деубиквитиназа UCH37 предпочтительнее связывается с разветвленными K6/K48-цепями, чем с цепями K11/K48 или K48/K63 [38]. Более того, выяснено, что смешанные цепи Ub⁶Ub⁴⁸Ub и Ub⁴⁸Ub⁶Ub почти не деубиквитинируются [38]. Цепи K48/K63 участвуют в ответе на введение IL-1β [22]. K11/K63-цепи, вероятно, участвуют в интернализации рецепторов [36]. Кроме того, считается, что образование смешанных цепей происходит во время эндоцитоза или иммунного ответа [20]. Сообщалось, что разветвленные цепи модифицируют эффекты, вызванные гомотипическими цепями [89].

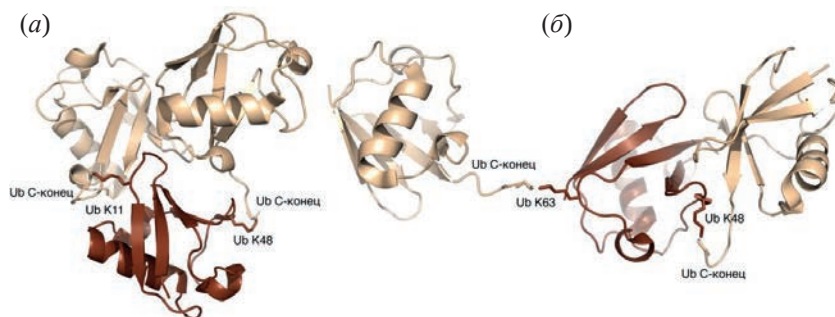


Рис. 12. Разветвленные K11/K48 (PDB: 6OQ1) (a) и K48/K63 цепи (PDB: 7NPO) (б).

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Убиквитинирование является одной из наиболее сложных для идентификации и изучения посттрансляционной модификаций из-за сложной структуры – образования цепей различной длины и типов связей, а также динамической регуляции. Конформация убиквитиновой цепи играет важнейшую роль в регуляции функции субстратов в различных физиологических и патологических клеточных процессах. Для идентификации убиквитинирования белка было разработано множество экспериментальных и вычислительных подходов, однако на настоящий момент экспериментальные методы – единственный способ получить представление об архитектуре убиквитиновых цепей. Вместе с тем ни один из существующих методов не может однозначно идентифицировать топологию и длину разветвленных цепей. Таким образом, для понимания архитектуры убиквитиновой цепи, ее точной структуры, а также физиологической функции крайне необходимо развитие новых методологий.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-10154).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kudriaeva A.A., Belogurov A.A. // *Biochemistry (Moscow)*. 2019. V. 84. P. 159–192. <https://doi.org/10.1134/S0006297919140104>
2. Kudriaeva A.A., Sokolov A.V., Belogurov A.A. // *Act. Nat.* 2020. V. 12. P. 18–32. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.10936>
3. Kudriaeva A.A., Lipkin V.M., Belogurov A.A. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. V. 493. P. 193–197. <https://doi.org/10.1134/S1607672920040079>
4. Bacheva A.V., Gotmanova N.N., Belogurov A.A., Kudriaeva A.A. // *Biochemistry (Moscow)*. 2021. V. 86. P. S71–S95. <https://doi.org/10.1134/S0006297921140066>
5. Komander D., Rape M. // *Annu. Rev. Biochem.* 2012. V. 81. P. 203–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060310-170328>
6. Yau R., Rape M. // *Nat. Cell Biol.* 2016. V. 18. P. 579–586. <https://doi.org/10.1038/ncb3358>
7. Kudriaeva A.A., Livneh I., Baranov M.S., Ziganshin R.H., Tupikin A.E., Zaitseva S.O., Kabilov M.R., Ciechanover A., Belogurov A.A. // *Cell. Chem. Biol.* 2021. V. 28. P. 1192–1205. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.02.009>
8. Huang Q., Zhang X. // *Proteomics*. 2020. V. 20. P. 1900100. <https://doi.org/10.1002/pmic.201900100>
9. Peng J., Schwartz D., Elias J.E., Thoreen C.C., Cheng D., Marsischky G., Roelofs J., Finley D., Gygi S.P. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 921–926. <https://doi.org/10.1038/nbt849>
10. Akimov V., Henningsen J., Hallenborg P., Rigbolt K.T.G., Jensen S.S., Nielsen M.M., Kratchmarova I., Blagoev B. // *J. Proteome Res.* 2014. V. 13. P. 4192–4204. <https://doi.org/10.1021/pr500549h>
11. Denis N.J., Vasilescu J., Lambert J., Smith J.C., Figeys D. // *Proteomics*. 2007. V. 7. P. 868–874. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600410>
12. Newton K., Matsumoto M.L., Wertz I.E., Kirkpatrick D.S., Lill J.R., Tan J., Dugger D., Gordon N., Sidhu S.S., Fellouse F.A., Komuves L., French D.M., Ferrando R.E., Lam C., Compaan D., Yu C., Bosanac I., Hymowitz S.G., Kelley R.F., Dixit V.M. // *Cell*. 2008. V. 134. P. 668–678. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.039>
13. Hjerpe R., Aillet F., Lopitz-Otsoa F., Lang V., England P., Rodriguez M.S. // *EMBO Rep.* 2009. V. 10. P. 1250–1258. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.192>
14. Xolalpa W., Mata-Cantero L., Aillet F., Rodriguez M.S. // *Methods Mol. Biol.* 2016. P. 161–175. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3756-1_8
15. Mattern M., Sutherland J., Kadimisetty K., Barrio R., Rodriguez M.S. // *Trends Biochem. Sci.* 2019. V. 44. P. 599–615. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.01.011>
16. Kadimisetty K., Sheets K.J., Gross P.H., Zerr M.J., Ouazia D. // *Methods Mol. Biol.* 2021. P. 185–202. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1665-9_10

17. He W., Wei L., Zou Q. // *Brief. Funct. Genomics*. 2019. V. 18. P. 220–229.
<https://doi.org/10.1093/bfpg/ely039>
18. Haakonsen D.L., Rape M. // *Trends Cell Biol.* 2019. V. 29. P. 704–716.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.06.003>
19. Hua X., Chu G.-C., Li Y.-M. // *Chembiochem*. 2020. V. 21. P. 3313–3318.
<https://doi.org/10.1002/cbic.202000295>
20. Meyer H.-J., Rape M. // *Cell*. 2014. V. 157. P. 910–921.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.037>
21. Fricker L.D. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2015. V. 26. P. 1981–1991.
<https://doi.org/10.1007/s13361-015-1231-x>
22. Kim M.-S., Zhong J., Pandey A. // *Proteomics*. 2016. V. 16. P. 700–714.
<https://doi.org/10.1002/pmic.201500355>
23. Ohtake F., Saeki Y., Ishido S., Kanno J., Tanaka K. // *Mol. Cell*. 2016. V. 64. P. 251–266.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.014>
24. Phu L., Izrael-Tomasevic A., Matsumoto M.L., Bustos D., Dynek J.N., Fedorova A.V., Bakalarski C.E., Arnott D., Deshayes K., Dixit V.M., Kelley R.F., Vucic D., Kirkpatrick D.S. // *Mol. Cell Proteomics*. 2011. V. 10. P. M110.003756.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M110.003756>
25. Xu P., Duong D.M., Seyfried N.T., Cheng D., Xie Y., Robert J., Rush J., Hochstrasser M., Finley D., Peng J. // *Cell*. 2009. V. 137. P. 133–145.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.041>
26. Ohtake F., Tsuchiya H., Tanaka K., Saeki Y. // *Methods Enzymol.* 2019. V. 618. P. 105–133.
<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.12.019>
27. Swatek K.N., Usher J.L., Kueck A.F., Gladkova C., Mevissen T.E.T., Pruneda J.N., Skern T., Komander D. // *Nature*. 2019. V. 572. P. 533–537.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1482-y>
28. Kaiho-Soma A., Akizuki Y., Igarashi K., Endo A., Shoda T., Kawase Y., Demizu Y., Naito M., Saeki Y., Tanaka K., Ohtake F. // *Mol. Cell*. 2021. V. 81. P. 1411–1424.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.01.023>
29. Akizuki Y., Morita M., Mori Y., Kaiho-Soma A., Dixit S., Endo A., Shimogawa M., Hayashi G., Naito M., Okamoto A., Tanaka K., Saeki Y., Ohtake F. // *Nat. Chem. Biol.* 2023. V. 19. P. 311–322.
<https://doi.org/10.1038/s41589-022-01178-1>
30. Geis-Asteggianti L., Lee A.E., Fenselau C. // *Methods Enzymol.* 2019. V. 626. P. 323–346.
<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.06.025>
31. Jülg J., Edbauer D., Behrends C. // *EMBO Rep.* 2023. V. 24. P. e55895.
<https://doi.org/10.15252/embr.202255895>
32. Yau R.G., Doerner K., Castellanos E.R., Haakonsen D.L., Werner A., Wang N., Yang X.W., Martinez-Martin N., Matsumoto M.L., Dixit V.M., Rape M. // *Cell*. 2017. V. 171. P. 918–933.e20.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.040>
33. Deol K.K., Crowe S.O., Du J., Bisbee H.A., Guenette R.G., Strieter E.R. // *Mol. Cell*. 2020. V. 80. P. 796–809.e9.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.10.017>
34. Waltho A., Sommer T. // *Methods Mol. Biol.* 2023. V. 2602. P. 19–38.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2859-1_2
35. Lee A.E., Geis-Asteggianti L., Dixon E.K., Kim Y., Kashyap T.R., Wang Y., Fushman D., Fenselau C. // *J. Mass Spectrom.* 2016. V. 51. P. 315–321.
<https://doi.org/10.1002/jms.3759>
36. Crowe S.O., Rana A.S.J.B., Deol K.K., Ge Y., Strieter E.R. // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. P. 4428–4434.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03675>
37. Sparks R.P., Fratti R. // *Methods Mol. Biol.* 2019. V. 1860. P. 191–198.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8760-3_11
38. Song A., Hazlett Z., Abeykoon D., Dortch J., Dillon A., Curtiss J., Martinez S.B., Hill C.P., Yu C., Huang L., Fushman D., Cohen R.E., Yao T. // *Elife*. 2021. V. 10. P. e72798.
<https://doi.org/10.7554/eLife.72798>
39. Seger C. // *Wien. Med. Wochenschr.* 2012. V. 162. P. 499–504.
<https://doi.org/10.1007/s10354-012-0147-3>
40. Pluska L., Jarosch E., Zauber H., Kniss A., Waltho A., Bagola K., von Delbrück M., Löhr F., Schulman B.A., Selbach M., Dötsch V., Sommer T. // *EMBO J.* 2021. V. 40. P. e106094.
<https://doi.org/10.15252/emboj.2020106094>
41. Ordureau A., Sarraf S.A., Duda D.M., Heo J.-M., Jedrychowski M.P., Sviderskiy V.O., Olszewski J.L., Koerber J.T., Xie T., Beausoleil S.A., Wells J.A., Gygi S.P., Schulman B.A., Harper J.W. // *Mol. Cell*. 2014. V. 56. P. 360–375.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.007>
42. Durcan T.M., Tang M.Y., Pérusse J.R., Dashti E.A., Aguilera M.A., McLelland G.-L., Gros P., Shaler T.A., Faubert D., Coulombe B., Fon E.A. // *EMBO J.* 2014. V. 33. P. 2473–2491.
<https://doi.org/10.15252/emboj.201489729>

43. *Cunningham C.N., Baughman J.M., Phu L., Tea J.S., Yu C., Coons M., Kirkpatrick D.S., Bingol B., Corn J.E.* // *Nat. Cell Biol.* 2015. V. 17. P. 160–169. <https://doi.org/10.1038/ncb3097>
44. *Kim W., Bennett E.J., Huttlin E.L., Guo A., Li J., Possemato A., Sowa M.E., Rad R., Rush J., Comb M.J., Harper J.W., Gygi S.P.* // *Mol. Cell.* 2011. V. 44. P. 325–340. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.025>
45. *Wagner S.A., Beli P., Weinert B.T., Nielsen M.L., Cox J., Mann M., Choudhary C.* // *Mol. Cell Proteomics.* 2011. V. 10. P. M111.013284. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.013284>
46. *Elia A.E.H., Boardman A.P., Wang D.C., Huttlin E.L., Everley R.A., Dephoure N., Zhou C., Koren I., Gygi S.P., Elledge S.J.* // *Mol. Cell.* 2015. V. 59. P. 867–881. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.006>
47. *Akutsu M., Dikic I., Bremm A.* // *J. Cell Sci.* 2016. V. 129. P. 875–880. <https://doi.org/10.1242/jcs.183954>
48. *Matsumoto M.L., Wickliffe K.E., Dong K.C., Yu C., Bosanac I., Bustos D., Phu L., Kirkpatrick D.S., Hymowitz S.G., Rape M., Kelley R.F., Dixit V.M.* // *Mol. Cell.* 2010. V. 39. P. 477–484. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.001>
49. *Rana A.S.J.B., Ge Y., Strieter E.R.* // *J. Proteome Res.* 2017. V. 16. P. 3363–3369. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00381>
50. *van Huizen M., Kikkert M.* // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. V. 7. P. 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00392>
51. *Qin Y., Zhou M.-T., Hu M.-M., Hu Y.-H., Zhang J., Guo L., Zhong B., Shu H.-B.* // *PLoS Pathog.* 2014. V. 10. P. e1004358. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004358>
52. *Jin S., Tian S., Chen Y., Zhang C., Xie W., Xia X., Cui J., Wang R.-F.* // *EMBO J.* 2016. V. 35. P. 866–880. <https://doi.org/10.15252/embj.201593596>
53. *Gatti M., Pinato S., Maiolica A., Rocchio F., Prato M.G., Aebersold R., Penengo L.* // *Cell Rep.* 2015. V. 10. P. 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.021>
54. *Sparrer K.M.J., Gableske S., Zurenski M.A., Parker Z.M., Full F., Baumgart G.J., Kato J., Pacheco-Rodriguez G., Liang C., Pornillos O., Moss J., Vaughan M., Gack M.U.* // *Nat. Microbiol.* 2017. V. 2. P. 1543–1557. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0017-2>
55. *Wang Q., Liu X., Cui Y., Tang Y., Chen W., Li S., Yu H., Pan Y., Wang C.* // *Immunity.* 2014. V. 41. P. 919–933. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.11.011>
56. *Zhao C., Jia M., Song H., Yu Z., Wang W., Li Q., Zhang L., Zhao W., Cao X.* // *Cell Rep.* 2017. V. 21. P. 1613–1623. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.020>
57. *Liu H., Li M., Song Y., Xu W.* // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 2479. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02479>
58. *Xue B., Li H., Guo M., Wang J., Xu Y., Zou X., Deng R., Li G., Zhu H.* // *J. Virol.* 2018. V. 92. P. e00321-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00321-18>
59. *Jin S., Tian S., Luo M., Xie W., Liu T., Duan T., Wu Y., Cui J.* // *Mol. Cell.* 2017. V. 68. P. 308.e4–322.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.005>
60. *He X., Zhu Y., Zhang Y., Geng Y., Gong J., Geng J., Zhang P., Zhang X., Liu N., Peng Y., Wang C., Wang Y., Liu X., Wan L., Gong F., Wei C., Zhong H.* // *EMBO J.* 2019. V. 38. P. e100978. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100978>
61. *Chen Y., Wang L., Jin J., Luan Y., Chen C., Li Y., Chu H., Wang X., Liao G., Yu Y., Teng H., Wang Y., Pan W., Fang L., Liao L., Jiang Z., Ge X., Li B., Wang P.* // *J. Exp. Med.* 2017. V. 214. P. 991–1010. <https://doi.org/10.1084/jem.20161387>
62. *Sun H., Zhang Q., Jing Y.-Y., Zhang M., Wang H.-Y., Cai Z., Liuyu T., Zhang Z.-D., Xiong T.-C., Wu Y., Zhu Q.-Y., Yao J., Shu H.-B., Lin D., Zhong B.* // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 15534. <https://doi.org/10.1038/ncomms15534>
63. *Imai J., Koganezawa Y., Tuzuki H., Ishikawa I., Sakai T.* // *Cell Biol. Int.* 2019. V. 43. P. 1393–1406. <https://doi.org/10.1002/cbin.11186>
64. *Kristariyanto Y.A., Choi S.-Y., Rehman S.A.A., Ritorito M.S., Campbell D.G., Morrice N.A., Toth R., Kulathu Y.* // *Biochem. J.* 2015. V. 467. P. 345–352. <https://doi.org/10.1042/BJ20141502>
65. *Michel M.A., Elliott P.R., Swatek K.N., Simicek M., Pruneda J.N., Wagstaff J.L., Freund S.M.V., Komander D.* // *Mol. Cell.* 2015. V. 58. P. 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.042>
66. *Yu Z., Chen T., Li X., Yang M., Tang S., Zhu X., Gu Y., Su X., Xia M., Li W., Zhang X., Wang Q., Cao X., Wang J.* // *Elife.* 2016. V. 5. P. e14087. <https://doi.org/10.7554/eLife.14087>
67. *Fei C., Li Z., Li C., Chen Y., Chen Z., He X., Mao L., Wang X., Zeng R., Li L.* // *Mol. Cell. Biol.* 2013. V. 33. P. 4095–4105. <https://doi.org/10.1128/MCB.00418-13>

68. Kristariyanto Y.A., Abdul Rehman S.A., Campbell D.G., Morrice N.A., Johnson C., Toth R., Kulathu Y. // *Mol. Cell*. 2015. V. 58. P. 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.041>
69. Licchesi J.D.F., Mieszczanek J., Mevissen T.E.T., Rutherford T.J., Akutsu M., Virdee S., El Oualid F., Chin J.W., Ovaa H., Bienz M., Komander D. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011. V. 19. P. 62–71. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2169>
70. Mevissen T.E.T., Hospenthal M.K., Geurink P.P., Elliott P.R., Akutsu M., Arnaudo N., Ekkebus R., Kulathu Y., Wauer T., El Oualid F., Freund S.M.V., Ovaa H., Komander D. // *Cell*. 2013. V. 154. P. 169–184. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.046>
71. Virdee S., Ye Y., Nguyen D.P., Komander D., Chin J.W. // *Nat. Chem. Biol.* 2010. V. 6. P. 750–757. <https://doi.org/10.1038/nchembio.426>
72. Tran H., Hamada F., Schwarz-Romond T., Bienz M. // *Genes Dev.* 2008. V. 22. P. 528–542. <https://doi.org/10.1101/gad.463208>
73. Besche H.C., Sha Z., Kukushkin N.V., Peth A., Hock E.-M., Kim W., Gygi S., Gutierrez J.A., Liao H., Dick L., Goldberg A.L. // *EMBO J.* 2014. V. 33. P. 1159–1176. <https://doi.org/10.1002/embj.201386906>
74. Jin J., Xie X., Xiao Y., Hu H., Zou Q., Cheng X., Sun S.-C. // *Nat. Immunol.* 2016. V. 17. P. 259–268. <https://doi.org/10.1038/ni.3347>
75. Kim J.-B., Kim S.Y., Kim B.M., Lee H., Kim I., Yun J., Jo Y., Oh T., Jo Y., Chae H.-D., Shin D.Y. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 12014–12021. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.436113>
76. Yuan W.-C., Lee Y.-R., Lin S.-Y., Chang L.-Y., Tan Y.P., Hung C.-C., Kuo J.-C., Liu C.-H., Lin M.-Y., Xu M., Chen Z.J., Chen R.-H. // *Mol. Cell*. 2014. V. 54. P. 586–600. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.035>
77. Kwon Y.T., Ciechanover A. // *Trends Biochem. Sci.* 2017. V. 42. P. 873–886. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.09.002>
78. Sorada T., Morimoto D., Walinda E., Sugase K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021. V. 562. P. 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.05.031>
79. Pickart C.M., Fushman D. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004. V. 8. P. 610–616. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.09.009>
80. Yang W.-L., Wang J., Chan C.-H., Lee S.-W., Campos A.D., Lamothe B., Hur L., Grabiner B.C., Lin X., Darnay B.G., Lin H.-K. // *Science*. 2009. V. 325. P. 1134–1138. <https://doi.org/10.1126/science.1175065>
81. Lim J., Yue Z. // *Dev. Cell*. 2015. V. 32. P. 491–501. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.02.002>
82. Ohtake F., Tsuchiya H. // *J. Biochem.* 2017. V. 161. P. 125–133. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw088>
83. Swatek K.N., Komander D. // *Cell Res.* 2016. V. 26. P. 399–422. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.39>
84. Uckelmann M., Sixma T.K. // *DNA Repair (Amst)*. 2017. V. 56. P. 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.06.011>
85. Nowsheen S., Aziz K., Aziz A., Deng M., Qin B., Luo K., Jeganathan K.B., Zhang H., Liu T., Yu J., Deng Y., Yuan J., Ding W., van Deursen J.M., Lou Z. // *Nat. Cell Biol.* 2018. V. 20. P. 455–464. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0071-x>
86. Maspero E., Valentini E., Mari S., Cecatiello V., Soffientini P., Pasqualato S., Polo S. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. P. 696–701. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2566>
87. Hospenthal M.K., Freund S.M.V., Komander D. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. P. 555–565. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2547>
88. Valkevich E.M., Sanchez N.A., Ge Y., Strieter E.R. // *Biochemistry*. 2014. V. 53. P. 4979–4989. <https://doi.org/10.1021/bi5006305>
89. Paudel P., Banos C.M., Liu Y., Zhuang Z. // *ACS Chem. Biol.* 2023. V. 18. P. 837–847. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.2c00898>
90. Wang Y.S., Wu K.P., Jiang H.K., Kurkute P., Chen R.H. // *Molecules*. 2020. V. 25. P. 5200. <https://doi.org/10.3390/molecules25215200>
91. Ohtake F. // *Trends Biochem Sci.* 2020. V. 45. P. 820821. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.04.008>
92. Sun M., Zhang X. // *Cell Biosci.* 2022. V. 12. P. 126. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00870-y>
93. Di Meo A., Pasic M.D., Yousef G.M. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. P. 52460–52474. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8931>
94. Neagu A.N., Jayathirtha M., Baxter E., Donnelly M., Petre B.A., Darie C.C. // *Molecules*. 2022. V. 27. P. 2411. <https://doi.org/10.3390/molecules27082411>
95. Singh G., Kumar S., Das R. // *Anal Chem.* 2023. V. 95. P. 10061–10067. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c01425>

Architectonics of Ubiquitin Chains

K. A. Ivanova^{*, #}, A. A. Belogurov^{*, #}, and A. A. Kudriaeva^{*}

[#] E-mail: anna.kudriaeva@ibch.ru; alexey.belogurov.jr@gmail.com

^{*} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

Ubiquitination, one of the most common posttranslational modifications of proteins, has a significant impact on its functions, such as stability, activity and cellular localization. Disorders in the processes of ubiquitination and deubiquitination are associated with various oncological and neurodegenerative diseases. The complexity of ubiquitin signaling – monoubiquitination and polyubiquitination with different lengths and types of interconnections between ubiquitins – determines their versatility and ability to regulate hundreds of different cellular processes. Advanced biochemical, mass spectrometric and computational methods are required for in-depth understanding of the mechanisms of assembly and disassembly, detection of ubiquitin chains and their signal transmission. Recent scientific achievements make it possible to identify the ubiquitination of proteins and the structure of ubiquitin chains, however, there are still a considerable number of unresolved issues in this area. Current review claims for a detailed analysis of the current understanding of the architectonics of the ubiquitin chains.

Keywords: *ubiquitin, polyubiquitin, ubiquitin chains, ubiquitin-proteasome system, ubiquitin ligase, deubiquitinase*



УДК 577.32

ТРАНСМЕМБРАННЫЕ ДОМЕНЫ БИТОПНЫХ БЕЛКОВ – КЛЮЧ К ПОНИМАНИЮ КЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

© 2024 г. А. А. Полянский*, Р. Г. Ефремов*, **, ***, #

* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики, Россия 101000 Москва, ул. Мясницкая, 20

*** Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9/3

Поступила в редакцию 08.12.2023 г.

После доработки 09.12.2023 г.

Принята к публикации 10.12.2023 г.

В работе систематически представлены результаты, полученные авторами с помощью вычислительных методов и подкрепленные экспериментальными биофизическими данными в ходе многолетних исследований битопных мембранных белков (БМБ) – важнейших участников клеточной сигнализации. Представленный материал не претендует на роль обзора, поскольку авторы не ставили своей задачей скрупулезно изложить состояние проблемы и дать исчерпывающую информацию из литературных источников. Скорее это эссе, в котором изложено понимание авторами базовых принципов организации трансмембранных доменов (ТМД) белков и их роли в функционировании клетки на основании полученного опыта исследований БМБ. Среди основных вопросов, которым посвящена работа, – тонко регулируемые процессы олигомеризации ТМД и непосредственный вклад в нее динамического мембранного окружения, центральная роль ТМД в функционировании рецепторных систем клетки и взаимосвязь всех компонентов белок-мембранных комплексов в передаче сигналов в норме и при патологиях.

Ключевые слова: мембранные белки, олигомеризация, молекулярно-биофизическая платформа, молекулярная динамика, “мембранный ответ”, белок-липидные взаимодействия, аллостерическая коммуникация в белках

DOI: 10.31857/S0132342324040048, **EDN:** MXDGKC

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	399
2. БИТОПНЫЕ МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ – УНИКАЛЬНАЯ СИСТЕМА В ИССЛЕДОВАНИИ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ	400
3. УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ПРИНЦИП УПАКОВКИ ТРАНСМЕМБРАННЫХ СПИРАЛЕЙ	401
4. АДАПТАЦИЯ К МЕМБРАННОМУ ОКРУЖЕНИЮ И “МЕМБРАННЫЙ ОТВЕТ”	403

Сокращения: БМБ – битопный мембранный белок; БР – бактериородопсин; МБ – мембранный белок; МД – молекулярная динамика; ПХ – перехватчик; ТМ – трансмембранный; ТМД – трансмембранный домен; ТМС – трансмембранный сегмент; РСА – рентгеноструктурный анализ; РТК – рецепторная тирозинкиназа; ЭМ – электронная микроскопия; GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белком (G-protein coupled receptor); PDGFRA – рецептор тромбоцитарного фактора роста (Platelet-derived growth factor receptor A).

Автор для связи: (тел. +7 (903) 743-16-56; эл. почта: efremov@nmr.ru).

5. АКТИВИРУЮЩИЕ ТРАНСМЕМБРАННЫЕ МУТАЦИИ	404
6. ДИНАМИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДИМЕРОВ, АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ КОММУНИКАЦИЯ И ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА	405
7. БИОМЕДИЦИНСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ – “МОЛЕКУЛЫ-ПЕРЕХВАТЧИКИ”, НАЦЕЛЕННЫЕ НА ТРАНСМЕМБРАННЫЕ ДОМЕНЫ БИТОПНЫХ БЕЛКОВ	407
8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	408
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	409

1. ВВЕДЕНИЕ

Выбор темы работы для ее представления в настоящем специальном номере журнала “Биоорганическая химия”, посвященном 90-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова, не случаен. Так, именно Юрий Анатольевич, будучи директором ИБХ АН СССР, в конце 1970-х – начале 1980-х гг. инициировал и очень активно, в свойственной ему манере, поддерживал проведение в ИБХ и в смежных научных организациях междисциплинарных исследований мембранных белков (МБ). Можно смело утверждать, что это был настоящий перелом в формулировке планов НИР Института и организаций, работающих в данной области, включая институты биоорганической химии в других городах и республиках СССР. В результате большая часть лабораторий ИБХ начала движение этим курсом. Кроме того, и сам журнал “Биоорганическая химия”, созданный Юрием Анатольевичем в 1975 г., с тех пор является “хранителем традиций” научного поиска в изучении МБ, основы которого были заложены еще первым составом редколлегии журнала под руководством юбиляра.

В отличие от водорастворимых белков (глобулярных, неупорядоченных, структурных и проч.), МБ имеют в своем составе участки (домены), взаимодействующие с клеточной мембраной либо с мембранами клеточных органелл. По типу связывания с мембраной МБ делятся на интегральные, периферические и так называемые “белки-трансформеры”. В настоящей работе речь пойдет о первых из них, хотя многие из рассматриваемых ниже принципов организации МБ и подходов к их изучению применимы и к двум другим классам. Разнообразные интегральные МБ, несколько тысяч которых закодировано в геноме человека [1],

обладают общим свойством – наличием трансмембранного (ТМ) домена (ТМД). Этот домен, вне зависимости от сложности своей структурной организации, отвечает за ряд базовых функций: локализацию в мембране, связь между цитоплазматическими и внеклеточными доменами, а также гомо- и гетероолигомеризацию. Необходимо отметить, что многие представители этого класса – важные элементы клеточной сигнализации, в которой ТМД, как это будет показано ниже, играют ключевую роль.

Первые успехи в установлении пространственной структуры интегральных МБ были достигнуты для белков, обладающих большими по размеру ТМД, состоящими как минимум из нескольких α -спиралей. Так, в фотореакционном центре *Rhodospseudomonas viridis* (первая пространственная структура белка с ТМД [2]) их по пять на субъединицу, в бактериородопсине (БР) и родопсине – по семь и т.д. Кроме того, на основании экспериментальных данных были построены модели поринов, обладающих полностью β -структурными ТМД. В этих случаях именно размер мембраносвязанных участков способствовал получению структурных данных с атомарным разрешением. Во-первых, в массивных ТМД наблюдается лишь относительно небольшая конформационная подвижность – за счет сильных взаимодействий между ТМ-сегментами (ТМС), что облегчает сбор экспериментальной информации. Во-вторых, структура таких прочно упакованных комплексов в гораздо меньшей степени зависит от особенностей водно-липидного окружения, хотя, конечно, его роль нельзя исключать. Это упрощает реконструкцию МБ в мембраноподобных средах при проведении структурных исследований. Необходимо отметить, что на этом

этапе основное внимание исследователей было сосредоточено на структуре, динамическом поведении, межмолекулярных взаимодействиях самих белков, в первую очередь, их ТМД. Так, детально были изучены молекулярные процессы, обеспечивающие фоторецепцию, в частности были выявлены и охарактеризованы, в том числе путем установления в экспериментах, пространственные структуры интермедиатов фотоциклов БР и зрительного родопсина (Р) [3, 4].

Наряду с экспериментальными подходами и на их основе активно развивались и методы молекулярного компьютерного моделирования. И в этом случае акцент делали на анализе свойств белка, а мембранное окружение часто рассматривали лишь как инертную матрицу, обладающую центральным гидрофобным слоем и более полярными интерфейсами на границе с водой. При этом считали, что мембрана в основном нужна для корректной адаптации ТМД белка, обеспечивая сохранение нативной структуры как его самого, так и внемембранных участков, задает правильную мембранную топологию белка и дает ему возможность необходимым образом взаимодействовать с партнерами в клетке – другими белками, лигандами и проч. Со временем, по мере накопления структурных данных, стало ясно, что помимо указанных выше трудностей и ограничений экспериментальных методов, понимание важнейших деталей структурной организации и, следовательно, механизмов работы МБ – гораздо более сложная задача, чем представлялось ранее. Например, одним из достижений в изучении белков с массивными ТМД стала идентификация их промежуточных состояний – интермедиатов, обладающих своими структурными особенностями, а также описание с высоким пространственно-временным разрешением переходов между ними. Однако для большинства других классов МБ решение этой задачи все еще оставалось недостижимым, хотя любой МБ, участвующий в передаче сигналов и информации, транспорте ионов и вещества, несомненно, обладает набором подобных промежуточных состояний. Последние, однако, не поддаются простой идентификации, как, например, в случае фоторецепции. Одна из основных проблем – отсутствие методов фик-

сации интермедиатов в состояниях, пригодных для структурных исследований современными методами. Более того, во многих случаях ТМД не статичны. Примерами служат белки с небольшим числом ТМС, претерпевающие в ходе работы сильные конформационные изменения, включая участие в межмолекулярных взаимодействиях с партнерами по клеточной мембране, что особенно характерно для сигнальных рецепторов. При этом водно-липидное окружение – динамическая среда, являющаяся активным участником процессов упаковки и функционирования белков, и ее влияние особенно значимо для указанных выше МБ. Однако эффекты среды необходимо учитывать и для белков с обширными ТМД – как было показано недавно, даже одиночные молекулы липидов клеточной мембраны могут играть ключевую роль в работе ионных каналов, например, таких как белки семейства TRP (Transient Receptor Potential), являющихся термочувствительными сенсорами [5].

2. БИТОПНЫЕ МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ – УНИКАЛЬНАЯ СИСТЕМА В ИССЛЕДОВАНИИ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ

Принимая во внимание всю сложность задач, стоящих перед исследователями, стремящимися расшифровать с атомистическими деталями организацию и механизмы действия МБ, представляется разумным начать работу, выбрав в качестве объектов наиболее “простые” с точки зрения структуры объекты – битопные МБ (БМБ), имеющие в своем составе единственный ТМД в α -спиральной конформации длиной ~20–30 а.о. В случае рецепторных тирозинкиназ (РТК), типичных представителей данного класса, это составляет всего несколько процентов от общей длины последовательности (например, в рецепторе фактора роста тромбоцитов, PDGFRA – 1089 а.о.). И в то же время, несмотря на свой незначительный размер, ТМД играет ключевую роль в функционировании РТК – достаточно одной точечной замены в его последовательности, чтобы вызвать патологическую активацию рецептора [6, 7], которая может затем привести к развитию онкологических и других заболеваний. Иными словами, незначитель-

ное изменение в ТМД способно кардинально влиять на характер клеточной сигнализации. При этом кажущаяся простота БМБ с лихвой компенсируется высокодинамичным характером их поведения в мембране – они формируют, как правило, непрочные комплексы с белками-партнерами. Кроме того, небольшие размеры ТМД обуславливают значительное влияние на их поведение окружающей мембраны, причем вклад взаимодействий с водно-липидной средой может превалировать над таковым для белок-белковых контактов. Своеобразным “триггером”, способствовавшим началу работ по теме исследований БМБ, стал анализ единственной на тот момент пространственной структуры ТМ-димера гликофорина А человека (GrA) [8]. Отметим, что по перечисленным выше причинам указанная модель, полученная К. MacKenzie методом спектроскопии ЯМР в мицеллах детергента, увидела свет значительно позднее (в 1997 г.), чем первые модели фотореакционного центра (1985) [2], BR (1975) [9] и других белков с массивными ТМД.

БМБ – обширный класс МБ, по данным базы Uniprot [10] в геноме человека содержится $\sim 10^3$ последовательностей I типа (ориентация $N \rightarrow C$ из внеклеточного пространства в цитоплазму), среди которых 64 – РТК, а также ~ 300 последовательностей II типа (ориентация $C \rightarrow N$ из внеклеточного пространства в цитоплазму). Поэтому, с одной стороны, изучение таких спиральных ТМД важно для понимания функции большого числа МБ, и в то же время минимально возможный размер этой системы делает ее уникальным исследовательским объектом для установления фундаментальных принципов организации ТМД и их роли в функционировании клетки. Такие ТМ-спирали обладают ключевой способностью к ассоциации в мембране. Например, в функциональном состоянии РТК обычно находятся в виде димеров, включая их ТМД. Димер ТМ α -спиралей – “минимальная функциональная единица”, он демонстрирует все базовые принципы работы, свойственные более сложноорганизованным ТМД белков: специфическую ассоциацию (упаковка в гомо- и гетероолигомеры), возмущение бислоя и адаптацию к нему, переключение между разными состояниями, активирующие ТМ-мутации, и,

наконец, передачу сигнала и аллостерическую коммуникацию между внеклеточными и цитоплазматическими доменами МБ (например, рецепторным и киназным в случае РТК). Именно эти базовые принципы, выявленные в ходе изучения спиральных ТМД, и рассмотрены ниже.

3. УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ПРИНЦИП УПАКОВКИ ТРАНСМЕМБРАННЫХ СПИРАЛЕЙ

Уже в одних из первых исследований МБ, выполненных на BR, был обнаружен интересный феномен – изолированные α -спирали в липидном бислое способны формировать укладку, сходную с таковой в исходном ТМД белка [11]. Это указывает на то, что непосредственная организация ТМД – взаимное расположение спиралей, области формирования контакта между спиральями (интерфейсы) – определяется не столько специфической работой клеточных машин, отвечающих за сборку МБ в мембране (транслокон) [12], сколько аминокислотной последовательностью спиралей и липидным окружением. Таким образом, существуют базовые физико-химические принципы, которые определяют, каким образом спирали будут взаимодействовать в мембране. В простейшем случае такие принципы будут определять организацию спирального ТМ-димера. Необходимость решения практической задачи предсказания пространственной конфигурации димеров ТМД для битопных белков потребовала определения ключевых принципов упаковки спиралей, которые были реализованы в алгоритме PREDDIMER [13]. Он позволяет предсказывать ансамбль пространственных димерных конфигураций для заданных аминокислотных последовательностей. В отличие от методов, выявляющих разные мотивы димеризации в ТМ-последовательностях (например, GxxxG [14]) и на основании этого реконструирующих пространственные структуры димеров, в PREDDIMER задача решается в общем виде, без непосредственной привязки к анализу белковых последовательностей. Димеризация в данном случае представлена как поиск оптимального соответствия между взаимодействующими α -спиральями, описываемыми в виде цилиндрических поверхностей с картированными физико-химическими свойст-

вами. Под соответствием понимается комплементарность рельефа (способность сформировать плотный контакт) и гидрофобности поверхности в области контакта. Кроме того, экспонированная поверхность димера должна соответствовать липидному окружению. Данные принципы, заложенные в основу алгоритма, отражают характер взаимодействия в мембранном окружении и, как будет показано далее, имеют сходную с гидрофобным эффектом энтропийную природу. В данном случае α -спирали в димере упаковываются таким образом, чтобы минимизировать шероховатость поверхности и соответствующее возмущение бислоя (см. далее), и при этом полярные остатки стремятся взаимодействовать друг с другом, не имея более выгодных партнеров внутри бислоя. Несмотря на кажущуюся простоту, алгоритм показал свою эффективность не только в

предсказании ТМ-димеров, но и тримеров [15–17], тетрамеров [18], эффекта точечных мутаций [19], а также в дизайне специфических пептидных модуляторов (“перехватчиков”, см. далее), нацеленных на ТМ-домены [20] (рис. 1). Это, в первую очередь, иллюстрирует относительную универсальность принципов упаковки спиралей, использованных в алгоритме. Подобная универсальность позволяет работать с любыми аминокислотными последовательностями (например, созданными *de novo*), а не только с биологическими, для которых существует возможность получить множественные выравнивания с гомологами, как, например, в популярном алгоритме предсказания белковых структур с использованием нейронных сетей AlphaFold [21, 22]. Важная особенность алгоритма PREDDIMER – не поиск уникального единичного решения, а выдача ранжированного

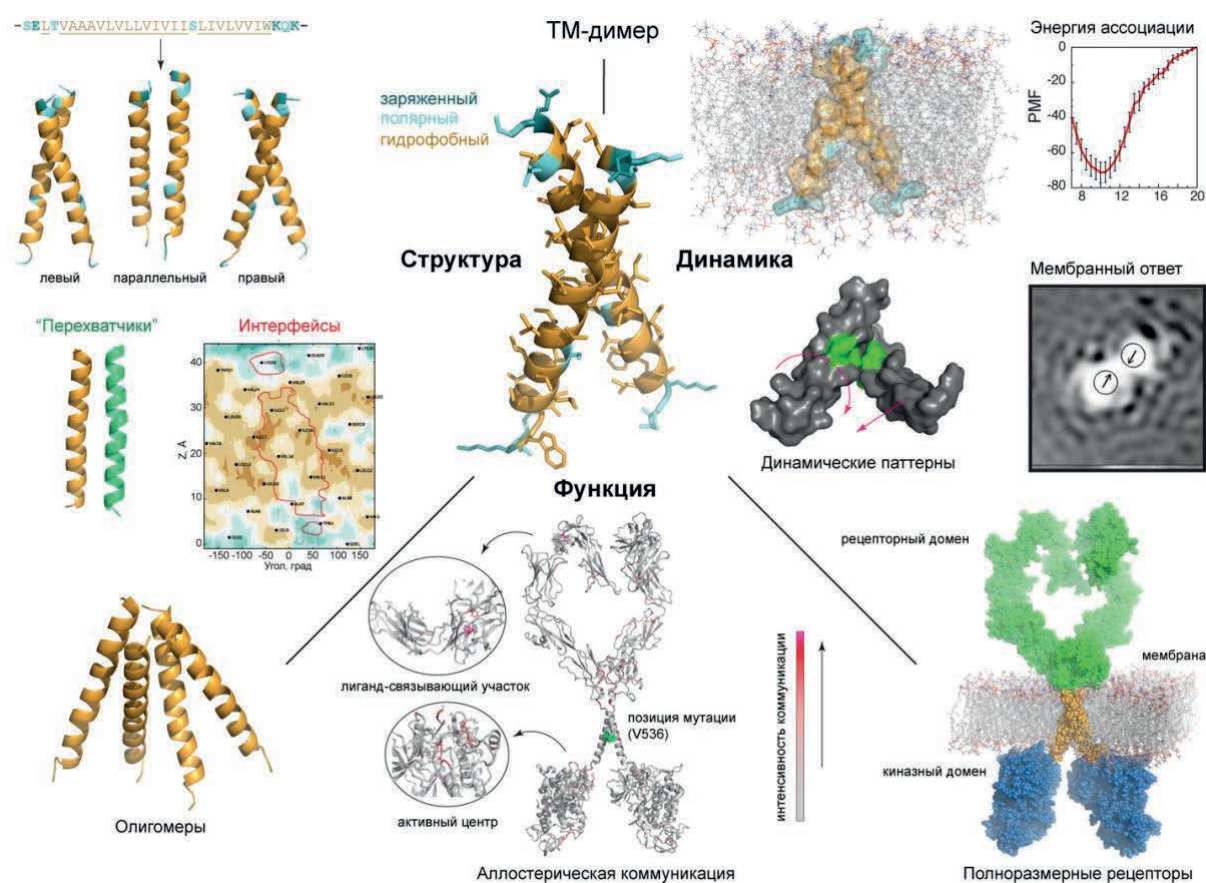


Рис. 1. Структурные, динамические и функциональные аспекты исследования ТМ-доменов БМБ с помощью молекулярно-биофизических методов моделирования. Для иллюстрации использованы ТМД и полноразмерный рецептор PDGFRA.

набора реалистичных конфигураций ТМ-димера (лево- и правозакрученные, параллельные, рис. 1) для заданных последовательностей, реализация которых будет определяться конкретным липидным окружением (см. далее).

4. АДАПТАЦИЯ К МЕМБРАННОМУ ОКРУЖЕНИЮ И “МЕМБРАННЫЙ ОТВЕТ”

Исследования динамического поведения ТМ-димеров в липидных бислоях с помощью методов моделирования (в первую очередь, молекулярной динамики, МД) и спектроскопии ЯМР выявили непосредственное влияние липидного окружения на соответствующую ему конфигурацию спиралей в димере [23–25]. Например, соотношение между “гидрофобной толщиной” бислоя и длиной ТМ-участка может определять топологию димера и его наклон в мембране [23]. Более того, в зависимости от параметров бислоя, энергетически выгодными могут быть разные димерные состояния (например, с малым или большим углом скрещивания между спиралями) из доступного набора, полученного на основании алгоритма PREDDIMER [24]. Таким образом, смена липидного окружения может приводить к смене конфигурации ТМ-димера [24] и, например, к соответствующей активации рецептора [25]. Известно, что ряд РТК активен только в определенном мембранном окружении (липидные рафты) [26–29]. Следовательно, ТМ-димер – своеобразный сенсор свойств липидной среды и то же время триггер разных состояний рецептора в процессе сигнализации. При этом последовательности ТМД кодируют не какое-то уникальное единичное димерное состояние, а статистический ансамбль различных состояний, реализация которых зависит от энергетического эффекта димеризации в конкретном липидном окружении [24]. Поэтому полноценное рассмотрение ТМ-димеров возможно лишь на уровне ансамблей состояний, что дает важную теоретическую основу для подхода, реализованного в алгоритме PREDDIMER. Наличие ансамбля состояний ТМ-димера дает возможность понимания механического вклада ТМД в функционирование рецепторов. Например, наиболее энергетически выгодное состояние ТМ-димера может соответствовать его конфигурации в неактивном рецепторе, в то время

как активная конфигурация оказывается отделена существенным энергетическим зазором, а также возможными промежуточными состояниями. В таком случае переход в активное состояние потребует дополнительного энергетического вклада, например, вследствие перестройки рецепторных доменов при связывании лиганда. В то же время благодаря возмущению, возникающему в результате внесения точечной мутации [30] (см. далее), или изменению среды [24] может происходить перераспределение состояний в доступном ансамбле, в результате чего наиболее выгодным становится активное состояние. Рассмотрение ТМ-димеров на уровне ансамблей состояний, а не единичной статичной конфигурации, дает фундаментальную основу в определении роли ТМД в процессе активации рецепторов, в том числе вследствие патологических ТМ-мутаций (см. далее).

Детальное понимание физического механизма, по которому бислой влияет на энергетику различных состояний и наиболее вероятную конфигурацию ТМ-димера, требует изучения так называемого “мембранного ответа”, или специфического возмущения мембраны, вызванного присутствием ТМС (рис. 1) [24, 25, 31]. Например, ТМ-димер может вызывать упорядочивание (“замораживание”) липидного окружения, что отражается на невыгодном энергетическом вкладе мембраны в энергию димеризации, в то же время в случае соответствия между конфигурацией ТМ-димера и параметрами бислоя наблюдается обратный эффект [24]. Более тонкие аспекты мембранного ответа связаны с возмущением липидного окружения внутри бислоя (гомогенности упаковки гидрофобных цепей), вносимым экспонированной поверхностью ТМ-спиралей в мономером и димерном состояниях. Например, заметное уменьшение степени гетерогенности упаковки липидов (возмущения) в процессе димеризации за счет изменения свойств экспонированной поверхности ТМ-спиралей связано с увеличением конфигурационной энтропии липидов и выгодным вкладом мембраны в свободную энергию димеризации [31]. Интересно, что данный эффект зависит от аминокислотного состава ТМ-спирали и особенно выражен для ТМ-димеров, имеющих протяженный интерфейс димеризации, который организован

по принципу “лейциновой молнии” (leucine zipper), в то время как ассоциация спиралей с преобладанием аминокислотных остатков с малыми боковыми группами может приводить к снижению конфигурационной энтропии липидов и быть менее выгодной [31]. Таким образом, оптимизация экспонированной поверхности ТМ-димера в соответствии с липидным окружением, которая влияет на характер упаковки спиралей и их конфигурацию в димере, имеет выраженную энтропийную природу. Адаптация к липидному окружению и соответствующий энтропийный эффект могут также лежать в основе переключения между неактивным и активным состоянием ТМ-димера, что указывает на возможность непосредственного участия мембраны в работе рецептора [25].

5. АКТИВИРУЮЩИЕ МУТАЦИИ В ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНАХ

Спонтанная активация рецепторов (в отсутствие сигнала, например, специфического лиганда) также может быть следствием точечных аминокислотных замен в их ТМ-доменах. Например, для ряда РТК известны ТМ-мутации, которые активируют рецептор, в то время как никакого реального взаимодействия с молекулой-активатором (например, фактором роста) не наблюдается [6, 7, 32]. Такие нарушения в системе клеточной сигнализации, когда, например, мутантная РТК “самовольно” инициирует каскады, активирующие процессы роста и деления клетки без “команды” извне, могут зачастую приводить к развитию наследственных заболеваний, а также разных форм рака [6, 7, 32]. Поэтому выявление механизмов активации рецепторов вследствие патологических наследственных и фенотипических мутаций в их ТМ-доменах – не только важная фундаментальная, но и социально значимая задача. Важным этапом в решении этой задачи стало понимание, что требуется рассмотрение эффекта мутаций на уровне ансамблей ТМ-димеров [19, 30], а также в различных молекулярных контекстах (рис. 1) – изолированные ТМ-димеры [32], встроенные в модельные мембраны [19, 30] олигомеры более высокого порядка и полноразмерные рецепторы [18] (см. далее). Внесение точечной замены может влиять на упаковку ТМ-спиралей в

димере, например, нарушая плотный контакт между спиралью в нативных конфигурациях и делая более выгодно упакованными альтернативные конфигурации димеров (изменение величины угла скрещивания между осями или типа закрутки спиралей). Это, в свою очередь, изменяет мембранный ответ в случае мутантных ТМ-димеров. Описанные эффекты лежат в основе влияния ТМ-мутаций на энергию ассоциации спиралей в ансамбле доступных состояний. Этот эффект можно оценить экспериментально в достаточно грубом приближении (например, системы ТОХСАТ [33]), а также детально исследовать помощью расчетов Монте-Карло и МД димерных состояний в модельных мембранах. В последнем случае атомистический уровень рассмотрения позволяет предложить физико-химический механизм активирующих мутаций. Например, такие ТМ-мутации могут вызвать перераспределение в ансамбле состояний и уменьшить энергетический зазор между неактивной и активной конфигурацией димера, увеличивая вероятность спонтанного переключения [30]. Более того, если в нативном ансамбле обычно существует доминантное (неактивное) состояние, отделенное от других состояний энергетическим зазором, то вследствие мутации может наблюдаться вырожденность ансамбля с большей вероятностью переключений между разными состояниями. Этот принцип можно проиллюстрировать с помощью конструирования *de novo* активирующих мутаций в ТМД РТК, используя в качестве критерия дизайна степень вырожденности ансамбля мутантного димера [24].

Активирующие мутации могут влиять не только непосредственно на упаковку ТМ-спиралей в димере, но и на способность формировать олигомеры более высокого порядка. Для изолированных мутантных ТМ-доменов РТК может наблюдаться тенденция к олигомеризации [24], отсутствующая у нативного домена, и, например, к формированию стабильных тетрамеров [18]. Это позволяет предложить также возможный биохимический механизм активации рецепторов с помощью ТМ-мутаций вследствие увеличения их склонности к олигомеризации. В таких олигомерах рецепторов повышается вероятность спонтанной реакции автофосфорилирования в резуль-

тате аномально высокой локальной концентрации киназных доменов и большего числа вариантов взаимной ориентации [18], что может также лежать в основе неспецифической (патологической) сигнализации. Интересно, что для многих патологических мутаций в белках различного типа наблюдается эффект повышения склонности к агрегации [34]. Поэтому такой механизм действия мутаций, видимо, является общим для многих систем клетки.

Необходимо отметить, что помимо энергетических эффектов ТМ-мутаций наблюдается непосредственное влияние таких замен на динамическое поведение спиралей в димере, а также на возможную коммуникацию внутри рецептора (см. далее). Поэтому понимание механизма действия той или иной мутации требует также исследования динамического поведения ТМ-димеров.

6. ДИНАМИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДИМЕРОВ, АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ КОММУНИКАЦИЯ И ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА

Рассматриваемые ТМ-димеры представляют собой динамическую систему, в которой индивидуальные спирали обладают вращательными и поступательными степенями свободы. Характер движений спиралей в ТМ-димере зависит от ряда факторов, таких как аминокислотный состав (например, присутствие полярных, заряженных и ароматических остатков), пространственная конфигурация (угол скрещивания и закрутка спиралей), липидное окружение (гидрофобная толщина, фазовое состояние, химический состав) и молекулярный контекст (изолированный ТМ-димер, полноразмерный рецептор). В изолированном димере в отсутствие внешних механических импульсов, как в полноразмерном рецепторе, движения спиралей модулируются непосредственно мембраной. Наряду с биофизическими методами, такими как ЯМР-спектроскопия, ключевым инструментом исследования динамического поведения подобных систем выступают расчеты МД, которые позволяют моделировать движения в ТМ-димере с характерными временами в пико-микросекундном диапазоне и с атомарным разрешением. Этот метод позволяет выяв-

лять характеристические паттерны подвижности ТМ-спиралей (рис. 1). Например, в зависимости от конфигурации димера наблюдаются частичные обратимые повороты спиралей относительно своих осей (движение по типу “шестеренок”), смещение спиралей друг относительно друга вдоль нормали к бислою (движение по типу “поршня”), а также поступательные движения относительно шарнира (движение по типу “ножниц”) [16, 19]. Такой паттерн подвижности определяет характер смещения *N*- и *C*-концевых участков относительно друг друга, а также синхронизацию этих изменений. Так, в случае движения спиралей по типу шестеренок изменения положения *N*-концевых участков полностью согласованы с таковыми в *C*-концевой области [19]. В случае полноразмерной РТК такой паттерн подвижности может играть ключевую роль в передаче сигнала от рецепторных доменов к киназным таким образом, что изменение конфигурации рецепторных доменов через ТМД влияет на взаимную ориентацию киназных доменов и их возможную активацию (автофосфорилирование). С другой стороны, в случае движения по типу ножниц за счет появления шарнира возможно механическое разобщение между *N*- и *C*-концевыми участками и нарушение передачи сигнала. Такое разобщение может возникнуть вследствие точечной мутации, как, например, в случае канцерогенной замены V536E в рецепторе PDGFRA [19, 32]. Замена алифатического остатка на полярный (Glu протонирован в бислое) меняет характер взаимодействия в центре ТМ-димера: вместо слабых ван-дер-ваальсовых контактов появляется “кросс-сшивки” из нескольких водородных связей, выполняющих функцию шарнира. Таким образом, эффект активирующих ТМ-мутаций может быть связан и с нарушением коммуникации внутри рецептора, и с “потерей контроля” над конфигурацией цитоплазматических доменов.

Аллостерическую коммуникацию в общем виде можно представить как обмен информацией между пространственно удаленными участками макромолекулы. Например, в случае РТК (рис. 1) белок (димер в активной форме) состоит из нескольких функциональных блоков, или доменов: рецепторных (внеклеточных), трансмембранных

(ТМ) и киназных (цитоплазматических). В этих доменах можно также выделить дополнительные функциональные элементы. Рецепторные домены имеют модульную организацию и, например, как в случае PDGFRA (рис. 1), состоят из последовательной цепочки пяти иммуноглобулиновых доменов (с сайтом связывания фактора роста во втором домене). Киназный домен, в свою очередь, включает активный сайт, активационную и каталитическую петлю. Гипотетически функционирование рецептора можно представить как передачу изменения конфигурации гибких рецепторных доменов в результате связывания димерного фактора роста через ТМ-область к киназным доменам, которые для активации должны принять асимметричную конфигурацию в димере. По аналогии с концепцией “белок–машина” Д.С. Чернавского, в простейшем виде такой рецептор можно рассматривать как механическую систему, в которой импульс передается вдоль аминокислотной цепи от *N*- к *C*-концу в виде последовательного изменения конфигураций. При этом димерные ТМД – своеобразное “бутылочное горлышко” в коммуникации между рецепторными (регуляторными) и киназными (каталитическими) доменами. Более сложные ТМД, как в случае G-белок-опосредованных рецепторов (GPCR), структурных гомологов БР, также играют ключевую роль в функционировании этих белков: специфические изменения конфигурации ТМД в ответ на связывание различных лигандов могут селективно модулировать взаимодействие с G-белком или аррестином и запускать соответствующие клеточные каскады [35]. Исследования динамических механизмов функционирования рецепторов требуют знания их пространственной структуры в полноразмерном виде. В отличие от более структурированных GPCR, для подвижных битопных белков кристаллографические данные можно получить только для изолированных киназных или рецепторных доменов [36]. Полноразмерная структура (в низком разрешении) может быть исследована с помощью современной электронной микроскопии (ЭМ) и молекулярного моделирования. При этом конфигурация ТМД в димерной РТК обычно недоступна ЭМ, поэтому для реконструкции полнораз-

мерной молекулы необходимо использовать данные ЯМР-спектроскопии [37] и моделирования (например, модели PREDDIMER) [18]. Развитие методов предсказания пространственной структуры белков на основании множественных выравниваний с использованием нейронных сетей (AlphaFold [21]) в сочетании с ЭМ, возможно, позволит более эффективно решать задачу получения пространственной структуры полноразмерных битопных рецепторов в разном олигомерном состоянии. Однако на сегодняшний день применимость AlphaFold для данной задачи ограничена ввиду сложности топологии МБ.

Знание пространственной структуры битопного рецептора в димерном состоянии, например, РТК, дает возможность детально исследовать механизмы коммуникации внутри молекулы, в частности с помощью расчетов МД. Стоит отметить, что такие модельные системы имеют внушительные размеры. Например, в случае рецептора PDGFR (рис. 1) полная МД-система (димер рецептора ~2000 а.о., липидный бислой, ионы и молекулы воды) обладает размерами $14 \times 14 \times 25$ нм³ и в полноатомном представлении содержит ~0.5 млн атомов. Однако развитие высокопроизводительных вычислительных платформ (в том числе с использованием графических ускорителей) позволяет на сегодняшний день осуществлять МД таких систем в полноатомном разрешении в микросекундном диапазоне [37]. На основании таких расчетов можно описывать характеристические движения в рецепторе и выявлять механические аспекты передачи сигнала, например, с помощью анализа гармонических мод (собственных векторов) [19]. Такой анализ в случае рецептора PDGFRA (рис. 1) показывает, что изменение угла скрещивания ТМ-спиралей и их поворот относительно друг друга сопряжены с изменением взаимной ориентации киназных и рецепторных доменов. Таким образом, данные моделирования непосредственно указывают на то, что полноразмерный димерный рецептор представляет собой динамическую систему сопряженных элементов, в которой изменения конфигурации в одних (например, в ТМД) отражаются на взаимной ориентации остальных. Поэтому модификация динамики ТМ-димера в случае мутации, как было

показано ранее, будет оказывать влияние и на подвижность сопряженных доменов, а также может лежать в основе аллостерического (активирующего) эффекта мутации. Однако эту гипотезу необходимо подтвердить в последующих исследованиях мутантных форм рецепторов.

Детальную картину коммуникации между различными позициями (аминокислотными остатками) внутри рецептора позволяют получать расчеты взаимной информации по данным МД [38]. Взаимная информация – величина, используемая в теории информации, которая позволяет оценивать согласованность между различными позициями в макромолекуле, например, в виде двумерных (2D) матриц попарных значений для всех аминокислотных остатков. Так, для рецептора PDGFRA анализ 2D взаимной информации позволяет выявлять наличие внутри молекулы информационных кластеров – групп остатков, демонстрирующих согласованное изменение степеней свободы и обменивающихся информацией (изменение конфигурации одного сопряжено с изменением структуры других остатков из данного кластера). Интересно, что такие кластеры могут быть перколирующими и пронизывают весь рецептор. Например, в рецепторе PDGFRA такой кластер образуют остатки, обменивающиеся информацией с центральной позицией в ТМД (V536), в которой обнаружена мутация, активирующая Glu (рис. 1). Интересно, что наиболее высокая интенсивность коммуникации в этой позиции наблюдается с рецепторными участками, связывающими фактор роста, а также с активным центром киназного домена, включающего активационную петлю. Таким образом, внутри рецептора можно выявить обширную сеть коммуникации между доменами и оценить непосредственный вклад ТМД в эту коммуникацию. Такой информационный обмен может, например, реализовываться в виде механического сопряжения, как было описано выше. В дальнейшем расчеты взаимной информации по данным МД позволят детально изучать вклад трансмембранных и других патогенных мутаций в коммуникацию внутри рецепторов и выявлять специфические паттерны активации.

7. БИМЕДИЦИНСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ: “МОЛЕКУЛЫ-ПЕРЕХВАТЧИКИ”, НАЦЕЛЕННЫЕ НА ТРАНСМЕМБРАННЫЕ ДОМЕНЫ БИТОПНЫХ БЕЛКОВ

Помимо сравнительной простоты БМБ и их чрезвычайно важной роли в процессах клеточной сигнализации, важен тот факт, что МБ с одним или двумя ТМС потенциально могут сильно реагировать на взаимодействие с внешними мембраносвязанными агентами. Как отмечалось выше, причина кроется в самой природе олигомеров ТМД – их конформационной подвижности и отсутствии прочного связывания. Таким образом, появляется возможность модулирования функции этих белков в клетке путем направленного воздействия на их ТМД, что имеет важное практическое значение в разработке новых подходов современной биомедицины для лечения социально-значимых заболеваний, таких как рак. Подобное вмешательство может иметь различную природу: как с помощью других молекул, влияющих на ТМД, так и опосредованно – за счет изменения эффектов среды. В первом случае речь идет о так называемой концепции “молекул-перехватчиков” (ПХ), в качестве которых выступают как другие ТМ-пептиды (“пептиды-перехватчики”), так и молекулы иной природы, включая, например, низкомолекулярные соединения и проч. К настоящему времени были опубликованы результаты успешного применения пептидов-перехватчиков как для БМБ, так и для ряда других белков с небольшими ТМД, способными к олигомеризации [20, 39, 40]. В роли пептидных ПХ можно применять, например, и мутантные формы ТМС, анализируя их воздействие как на структурно-динамические характеристики димеров, так и на их работу в клетке. В качестве мишени действия ПХ может выступать весь ТМ-димер и/или образующие его индивидуальные α -спирали. Кроме того, мишенью могут быть и белковые системы, не относящиеся непосредственно к целевому ТМД (например, его примембранные участки); способные взаимодействовать с ним ТМС соседних белков-партнеров и т.д. При выборе стратегии проектирования и применения ПХ возможно несколько вариантов:

1) ПХ образует с мишенью комплекс, более прочный, чем исходный ТМ-димер. В результате ПХ конкурирует за связывание с мономерами природного димера, блокируя (сильно меняя) его работу в клетке. В случае гомодимера речь идет об одном варианте ПХ, а при рассмотрении гетеродимера возможны и две разновидности ПХ, селективно распознающие каждый из мономеров мишени;

2) ПХ связывается с уже сформированным ТМ-димером, полностью не разрушая его, т.е. не замещая один из исходных мономеров. После этого мишень может по-прежнему функционировать, но с измененными характеристиками, например, с параметрами активации/деактивации, отличающимися от свойственных природному рецептору;

3) ПХ непосредственно не взаимодействует с мишенью, а связывается, например, с примембранным участком ТМ-димера либо с ТМД соседних белков. Отметим, что это достаточно распространенный случай, поскольку БМБ, такие как РТК, часто работают “в оркестре”, т.е. большими группами близко расположенных димеров. Подобное взаимодействие может влиять как на структурно-динамические свойства самой ТМ-мишени, так и на свойства ее локального окружения (водно-липидной среды, присутствия рядом других белков и т.д.). В частности, одно из последствий этих процессов – изменение локальной диэлектрической проницаемости среды, в свою очередь, способное сильно менять параметры Н-связей и других взаимодействий с участием ТМ-димера; как следствие, его работа также будет нарушена. К указанному варианту можно отнести и еще слишком мало изученные эффекты аллостерии, за счет которых вызываемые ПХ возмущения в отдалении от мишени потенциально способны повлиять на ее работу в клетке (см. выше).

8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проиллюстрирована многогранность исследовательских вопросов, в фокусе которых находятся ТМД битопных белков, а также ряд установленных за последние 20 лет принципов их организации и участия в функцио-

нировании МБ. Изучение этих разных аспектов требует привлечения широкого арсенала биофизических и модельных подходов, которые позволяют определять конфигурацию ТМ-димеров, описывать их динамику и энергетические характеристики, стабильность, эффекты мутаций, роль липидного окружения, исследовать аллостерическую коммуникацию и роль ТМД в передаче сигнала, а также проектировать молекулы-перехватчики. В частности, были представлены результаты использования молекулярно-биофизической платформы, созданной в ИБХ РАН для исследования структуры, динамики и функции МБ (преимущественно БМБ), причем в качестве основного экспериментального метода получения структурных данных используется гетероядерная ЯМР-спектроскопия в растворе. Этот подход хорошо себя зарекомендовал в анализе конформационно пластичных олигомеров небольшого размера (димеры, тетрамеры), способных менять упаковку ТМС под влиянием мембранного окружения, ПХ различной природы и т.д. Однако с его помощью не удастся получать структурную информацию высокого разрешения для МБ с массивными ТМД – большинства классов рецепторов (включая GPCR), ионных каналов, фотореакционных центров и т.д. Для изучения подобных объектов традиционно применяют методы рентгеноструктурного анализа (РСА), а в последние годы – крио-ЭМ. Учитывая сложность структурной организации этих мезоскопических белок-мембранных систем, а также необходимость расшифровки атомистических деталей их работы в клеточной мембране, применения одних лишь методов РСА и крио-ЭМ совершенно недостаточно. Как обсуждалось выше для БМБ, требуется комплексное изучение проблемы – согласованное применение экспериментальных и вычислительных методов. Именно поэтому в мире созданы и давно действуют международные консорциумы по изучению мембранных белков – как глобальные (Membrane Protein Structural Biology Consortium), так и региональные [41]. Отметим, что такие объединения существуют в том числе по отдельным аспектам проблематики, например, посвященным анализу МБ методами

МД (Membrane Protein Structural Dynamics Consortium).

Многолетний исследовательский опыт авторов показывает, что такое комплексное рассмотрение позволяет прийти к пониманию не только специфической роли ТМД, но и принципов функционирования мембранных рецепторов в целом, эффектов патологических мутаций и выработке новых стратегий в терапии. Таким образом, несмотря на кажущуюся простоту системы “димер ТМ-спиралей”, чтобы выявить принципы, по которым она работает, требуется систематический (“холистический”) подход и в то же время серьезные исследования на каждом уровне. Более того, как было показано, ТМД – это потенциальный ключ к пониманию механизма работы рецепторов, поскольку они играют в нем центральную роль. Связывая внеклеточные и цитоплазматические домены, ТМД отвечают за локализацию белка в мембране и его взаимодействие с мембранным окружением. Другими словами, они представляют собой своего рода точку отсчета в понимании молекулярных аспектов клеточной сигнализации и передачи информации. Авторы выражают надежду на то, что разработанные методы, технологии, алгоритмы, а также накопленный опыт изучения разных типов МБ, находящихся в специфическом мембранном окружении, вносят ценный вклад в понимание общих принципов организации и работы белок-мембранных комплексов – одних из самых сложных молекулярных систем в биологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Э.В. Бочарову за многолетнее сотрудничество и обсуждение затронутых в исследовании проблем.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 23-14-00313).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Engel A., Gaub H.E. // *Ann. Rev. Biochem.* 2008. V. 77. P. 127–148.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062706.154450>
2. Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R., Michel H. // *Nature*. 1985. V. 318. P. 618–624.
<https://doi.org/10.1038/318618a0>
3. Ernst O.P., Lodowski D.T., Elstner M., Hegemann P., Brown L.S., Kandori H. // *Chem. Rev.* 2014. V. 114. P. 126–163.
<https://doi.org/10.1021/cr4003769>
4. Kandori H. // *Biophys. Rev.* 2020. V. 12. P. 355–361.
<https://doi.org/10.1007/s12551-020-00645-0>
5. Nadezhdin K.D., Neuberger A., Trofimov Y.A., Krylov N.A., Sinica V., Kupko N., Vlachova V., Zakharian E., Efremov R.G., Sobolevsky A.I. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2021. V. 28. P. 564–572.
<https://doi.org/10.1038/s41594-021-00615-4>
6. Cymer F., Schneider D. // *Cell Adh. Migr.* 2010. V. 4. P. 299–312.
<https://doi.org/10.4161/cam.4.2.11191>
7. Bugge K., Lindorff-Larsen K., Kragelund B.B. // *FEBS J.* 2016. V. 283. P. 4424–4451.
<https://doi.org/10.1111/febs.13793>
8. MacKenzie K.R., Prestegard J.H., Engelman D.M. // *Science*. 1997. V. 276. P. 131–133.
<https://doi.org/10.1126/science.276.5309.131>
9. Henderson R., Unwin P.N.T. // *Nature*. 1975. V. 257. P. 28–32.
<https://doi.org/10.1038/257028a0>
10. Consortium T.U. // *Nucleic Acids Res.* 2022. V. 51. P. D523–D531.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
11. Kahn T.W., Engelman D.M. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 6144–6151.
<https://doi.org/10.1021/bi00141a027>
12. White S.H., von Heijne G. // *Annu. Rev. Biophys.* 2008. V. 37. P. 23–42.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125904>
13. Polyansky A.A., Chugunov A.O., Volynsky P.E., Krylov N.A., Nolde D.E., Efremov R.G. // *Bioinformatics*. 2013. V. 30. P. 889–890.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt645>
14. Russ W.P., Engelman D.M. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 296. P. 911–919.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3489>
15. Kordyukova L.V., Serebryakova M.V., Polyansky A.A., Kropotkina E.A., Alexeevski A.V., Veit M., Efremov R.G., Filippova I.Y., Baratova L.A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2011. V. 1808. P. 1843–1854.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.03.005>

16. Zhang L., Polyansky A., Buck M. // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0121513. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121513>
17. Aliper E.T., Krylov N.A., Nolde D.E., Polyansky A.A., Efremov R.G. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 9221. <https://doi.org/10.3390/ijms23169221>
18. Polyansky A.A., Efremov R.G. // Comput. Struct. Biotechnol. J. 2023. V. 21. P. 2837–2844. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.04.021>
19. Polyansky A.A., Bocharov E.V., Velghe A.I., Kuznetsov A.S., Bocharova O.V., Urban A.S., Arseniev A.S., Zagrovic B., Demoulin J.B., Efremov R.G. // Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 2019. V. 1863. P. 82–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.09.011>
20. Albrecht C., Kuznetsov A.S., Appert-Collin A., Dhaid-eh Z., Callewaert M., Bershatsky Y.V., Urban A.S., Bocharov E.V., Bagnard D., Baud S., Blaise S., Romier-Crouzet B., Efremov R.G., Dauchez M., Duca L., Gueroult M., Maurice P., Bennasroune A. // Front. Cell Dev. Biol. 2020. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.611121>
21. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Židek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S.A.A., Ballard A.J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstern S., Silver D., Vinyals O., Senior A.W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. // Nature. 2021. V. 596. P. 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
22. Sahoo A.R., Souza P.C.T., Meng Z., Buck M. // Structure. 2023. V. 31. P. 735–745.e2. <https://doi.org/10.1016/j.str.2023.03.014>
23. Muhle-Goll C., Hoffmann S., Afonin S., Grage S.L., Polyansky A.A., Windisch D., Zeitler M., Bürck J., Ulrich A.S. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. P. 26178–26186. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325555>
24. Polyansky A.A., Volynsky P.E., Efremov R.G. // J. Am. Chem. Soc. 2012. V. 134. P. 14390–14400. <https://doi.org/10.1021/ja303483k>
25. Bocharov E.V., Bragin P.E., Pavlov K.V., Bocharova O.V., Mineev K.S., Polyansky A.A., Volynsky P.E., Efremov R.G., Arseniev A.S. // Biochemistry. 2017. V. 56. P. 1697–1705. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01085>
26. Roepstorff K., Thomsen P., Sandvig K., van Deurs B. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 18954–18960. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201422200>
27. Sottocornola E., Misasi R., Mattei V., Ciarlo L., Gradi-ni R., Garofalo T., Berra B., Colombo I., Sorice M. // FEBS J. 2006. V. 273. P. 1821–1830. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05203.x>
28. Rohwedder A., Knipp S., Roberts L.D., Ladbury J.E. // Sci. Rep. 2021. V. 11. P. 6160. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85578-8>
29. Roy A., Patra S.K. // Stem Cell Rev. Rep. 2022. V. 19. P. 2–25. <https://doi.org/10.1007/s12015-022-10448-3>
30. Volynsky P.E., Polyansky A.A., Fakhrutdinova G.N., Bocharov E.V., Efremov R.G. // J. Am. Chem. Soc. 2013. V. 135. P. 8105–8108. <https://doi.org/10.1021/ja4011942>
31. Kuznetsov A.S., Polyansky A.A., Fleck M., Volynsky P.E., Efremov R.G. // J. Chem. Theory Comput. 2015. V. 11. P. 4415–4426. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00206>
32. Velghe A.I., Van Cauwenberghe S., Polyansky A.A., Chand D., Montano-Almendras C.P., Charni S., Hall-berg B., Essaghir A., Demoulin J.B. // Oncogene. 2014. V. 33. P. 2568–2576. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.218>
33. Russ W.P., Engelman D.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 863–868. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.863>
34. De Baets G., Van Doorn L., Rousseau F., Schymkowitz J. // PLoS Comput. Biol. 2015. V. 11. P. e1004374. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004374>
35. Suomivuori C.-M., Latorraca N.R., Wingler L.M., Eismann S., King M.C., Kleinhenz A.L.W., Skiba M.A., Staus D.P., Kruse A.C., Lefkowitz R.J., Dror R.O. // Science. 2020. V. 367. P. 881–887. <https://doi.org/10.1126/science.aaz0326>
36. Chen P.H., Unger V., He X. // J. Mol. Biol. 2015. V. 427. P. 3921–3934. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.003>
37. Arkhipov A., Shan Y., Das R., Endres N.F., Eastwood M.P., Wemmer D.E., Kuriyan J., Shaw D.E. // Cell. 2013. V. 152. P. 557–569. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.030>
38. Fleck M., Polyansky A.A., Zagrovic B. // J. Chem. Theory Comput. 2016. V. 12. P. 2055–2065. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b01217>
39. Westerfield J.M., Barrera F.N. // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. P. 1792–1814. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.009457>
40. Mitchell C.J., Johnson T.S., Deber C.M. // Biophys. J. 2022. V. 121. P. 3253–3262. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.07.026>
41. Love J., Mancina F., Shapiro L., Punta M., Rost B., Girvin M., Wang D.-N., Zhou M., Hunt J.F., Szyperski T., Gouaux E., MacKinnon R., McDermott A., Honig B., Inouye M., Montelione G., Hendrickson W.A. // J. Struct. Funct. Genomics. 2010. V. 11. P. 191–199. <https://doi.org/10.1007/s10969-010-9094-7>

Transmembrane Domains of Bitopic Proteins As a Key to Understand the Cellular Signaling

A. A. Polyansky* and R. G. Efremov*, **, ***, #

Phone: +7 (903) 743-16-56; e-mail: efremov@nmr.ru

* Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** National Research University Higher School of Economics, ul. Myasnitskaya 20, Moscow 101000 Russia

*** Moscow Institute of Physics and Technology (State University),
Institutsky per. 9/3, Dolgoprudny, 141701 Russia

This work presents in a systematic manner key modeling results corroborated by experimental biophysical data and obtained by the authors during long-term research on bitopic (single-pass) membrane proteins (BMP), which are the crucial elements of cell signaling. The manuscript does not claim to be a comprehensive review on the topic, whereby the authors did not aim to describe accurately the current state of the art, given the numerous reliable publications. Rather, it is an essay illustrating the authors' understanding of the basic principles in organization of transmembrane protein domains (TMD) and their contribution to the cell functioning. Among the key topics highlighted in the present work are the fine-tuned processes of TMD oligomerization and direct contribution of the dynamic membrane environment to this process, the key role of TMD in the functioning of cell receptors and mutual relations between all components of protein-membrane complexes during the signal transduction in normal and pathological conditions.

Keywords: membrane proteins, oligomerization, molecular-biophysical framework, molecular dynamics, "membrane response", protein-lipid interactions, allosteric communication in proteins



УДК 615.03;615.32;612.06

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РЕГУЛИРОВАНИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗВИТИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА ВТОРОГО ТИПА

© 2024 г. Н. А. Бороздина*, **, #, Д. В. Попкова***, И. А. Дьяченко*, **

* Филиал ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 6

** Пущинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)”, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 3

*** ФГБУН “Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова” ДВО РАН, Россия, 690022 Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159

Поступила в редакцию 27.10.2023 г.

После доработки 11.11.2023 г.

Принята к публикации 12.11.2023 г.

У веществ природного происхождения во множестве исследований подтверждено выраженное сродство к мишеням, ответственным за развитие патологических процессов при сахарном диабете 2-го типа. На данный момент растет интерес к биоактивным пептидам и низкомолекулярным соединениям, обнаруженным в растительных экстрактах и водорослях, морской фауне, как к высокоэффективным, безопасным и многообещающим противодиабетическим средствам. Биоактивные пептиды и фитотерапевтические препараты могут стать хорошей альтернативой имеющимся средствам для лечения сахарного диабета 2-го типа. В обзоре описаны способы снижения инсулинорезистентности и повышения чувствительности тканей к глюкозе через PTP1 β (протеинтирозинфосфатазу 1 β), GLP-1R (рецептор глюкагоноподобного пептида), DPP-4 (дипептидилпептидазу-4), AMPK (аденозинмонофосфат-активированную протеинкиназу) и MAPK (митоген-активированную протеинкиназу). Представлены способы регулирования ожирения и развития окислительного стресса через CCN3 (сверхэкспрессируемый ген нефробластомы), PPAR- γ (γ -рецептор, активируемый пролифератором пероксисом), NRF2 (ядерный фактор, связанный с эритроидным фактором 2), FFA (свободные жирные кислоты), FFAR (рецепторы свободных жирных кислот), 11 β -HSD1 (11 β -гидроксистероиддегидрогеназу). Рассмотрено регулирование гипергликемии через ингибиторы α -амилаз, регулирование накопления и расходования глюкозы через GFAT (глутаминфруктозо-6-фосфатаминотрансферазу), FOXO1 (фактор транскрипции, кодируемый геном *FOXO1*), GLUT4 (глюкозный транспортер 4-го типа), PGC-1 α (коактиватор 1 α -рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом). В обзоре рассмотрено применение низкомолекулярных и пептидных соединений из природных источников, которые являются модуляторами мишеней и сигнальных путей *in vitro* и *in vivo*, участвующих в развитии сахарного диабета 2-го типа.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, окислительный стресс, гипергликемия, инсулинорезистентность

DOI: 10.31857/S0132342324040057, **EDN:** MXCDMS

Сокращения: СД2 – сахарный диабет 2-го типа; GLUT4 – глюкозный транспортер 4-го типа; IRS1 – субстрат инсулинового рецептора 1; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; PTP1 β – протеинтирозинфосфатаза 1 β ; AMPK – 5'-аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа; Erk1 – внеклеточная сигнал-регулируемая киназа 1; SIRT1 – сиртуин 1; PGC-1 α – транскрипционный коактиватор рецептора γ , активирующий пролифератор пероксисомы 1; FOXO1 – фактор транскрипции, кодируемый геном *FOXO1*; mTOR – мишень пути рапамицина; 11 β -HSD1 – 11 β -гидроксистероиддегидрогеназа; FFA – свободные жирные кислоты; GLP-1 – глюкагоноподобный пептид-1; GIP – глюкозозависимый инсулинотропный полипептид; DPP-4 – дипептидилпептидаза-4; SGLT2 – натрий-глюкозный котранспортер 2-го типа; QSAR – количественное соотношение структура–свойство; GFAT – глутаминфруктозо-6-фосфатаминотрансфераза; CCN3 – сверхэкспрессируемый ген нефробластомы; PPAR- γ – гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом; Nrf2 – ядерный фактор, связанный с эритроидным фактором 2.

Автор для связи: (тел. +7 (977) 358-52-97; эл. почта: borozdina@bibch.ru).

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	414
2. ТРАНСПОРТЕРЫ ГЛЮКОЗЫ (GLUT)	414
2.1. Активаторы GLUT	414
3. СУБСТРАТ ИНСУЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА 1 (IRS1)	415
3.1. Активаторы IRS1	421
4. ПРОТЕИНТИРОЗИНФОСФАТАЗА 1 β (PTP1 β)	421
4.1. Ингибиторы PTP1 β	421
5. ПУТЬ AMPK/SIRT1/PGC-1 α	422
5.1. Регуляторы пути AMPK/SIRT1/PGC-1 α	422
6. ПУТЬ Akt/ERK1/2/P38 MAPK	423
6.1. Регуляторы пути Akt/Erk1/2/P38 MAPK	423
7. ПУТЬ ФОСФОИНОЗИТИД-3-КИНАЗА (PI3K)/ПРОТЕИНКИНАЗА В (Akt)/МИШЕНЬ ПУТИ РАПАМИЦИНА (MTOR)	423
7.1. Регулирование пути PI3K/Akt/mTOR	423
8. 11 β -ГИДРОКСИСТЕРОИДДЕГИДРОГЕНАЗА	424
8.1. Ингибиторы 11 β -HSD1	424
9. FOXO1 (ФАКТОР ТРАНСКРИПЦИИ, КОДИРУЕМЫЙ ГЕНОМ FOXO1)	424
9.1. Ингибиторы FOXO1	424
10. FFA-РЕЦЕПТОРЫ (РЕЦЕПТОРЫ СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ)	425
10.1. Ингибиторы FFA-рецепторов	425
11. ГЛЮКАГОНОПОДОБНЫЙ ПЕПТИД-1 (GLP-1) И ГЛЮКОЗОЗАВИСИМЫЙ ИНСУЛИНОТРОПНЫЙ ПОЛИПЕПТИД (GIP)	425
11.1. Агонисты GLP-1 и GIP	425
11.2. Ингибиторы DPP-4	426
12. НАТРИЙ-ГЛЮКОЗНЫЙ КОТРАНСПОРТЕР ТИПА 2 (SGLT2)	426
12.1. Ингибиторы SGLT2	427
13. α -ГЛИКОЗИДАЗЫ	427
13.1. Ингибиторы α -гликозидаз	427
14. ГЛУТАМИНФРУКТОЗО-6-ФОСФАТАМИНОТРАНСФЕРАЗА (GFAT)	428
14.1. Ингибиторы GFAT	429
15. CCN3, или NOV (СВЕРХЭКСПРЕССИРУЕМЫЙ ГЕН НЕФРОБЛАСТОМЫ)	429
15.1. Ингибиторы CCN3	429
16. PPAR- γ (ГАММА-РЕЦЕПТОР, АКТИВИРУЕМЫЙ ПРОЛИФЕРАТОРОМ ПЕРОКСИСОМ)	429
16.1. Активаторы PPAR- γ	429
17. Nrf2 (ЯДЕРНЫЙ ФАКТОР, СВЯЗАННЫЙ С ЭРИТРОИДНЫМ ФАКТОРОМ 2)	430
17.1. Активаторы Nrf2	430
18. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	430
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	431

1. ВВЕДЕНИЕ

Около 422 миллионов человек во всем мире живут с сахарным диабетом, большинство из них – из стран с низким и средним уровнем дохода; с диабетом напрямую связаны 1.5 миллиона смертей ежегодно. Глобальный отчет Всемирной организации здравоохранения о диабете показывает, что число взрослых, больных сахарным диабетом, увеличилось почти в 4 раза с 1980 г. до 422 миллионов, с предположительным ростом до 693 миллионов человек к 2045 г. [1, 2]. Заболевание характеризуется высоким уровнем глюкозы в крови из-за дефицита концентрации и/или активности инсулина – гормона поджелудочной железы, участвующего в обмене глюкозы [3].

В последнее десятилетие было разработано много пероральных лекарственных препаратов для лечения сахарного диабета 2-го типа (СД2) [4]. К основным мишеням, на которые действуют данные препараты, относятся стимуляторы секреции инсулина, имитаторы и сенситизаторы инсулина, а также ингибиторы α -амилаз [5]. Эффективность и безопасность новых зарегистрированных препаратов еще предстоит подробно изучить [3]. На данный момент в стандартной терапии СД2 в качестве пероральных препаратов широко применяют метформин и акарбозу [6].

Необходимость в разработке терапевтических препаратов с меньшим количеством побочных эффектов до сих пор не удовлетворена из-за ограниченной эффективности более низких доз [7, 8]. В будущем разработка терапевтических средств для лечения сахарного диабета должна следовать целостному подходу. По мнению Kanwal et al. [9], стратегии разработки лекарств должны быть нацелены на изучение механизмов эффективного гликемического контроля. Поиск новых мишеней – важный этап в формировании новых терапевтических стратегий для лечения СД2. Новые препараты должны иметь более выраженную эффективность и смягчать прогрессирование вызванных диабетом сердечно-сосудистых осложнений [9].

У веществ природного происхождения во множестве исследований подтверждено выраженное средство к мишеням, ответственным за раз-

витие патологических процессов при СД2. На данный момент растет интерес к биоактивным пептидам, фитохимическим препаратам, низкомолекулярным препаратам из других природных источников как к более безопасным и многообещающим противодиабетическим средствам [10, 11].

2. ТРАНСПОРТЕРЫ ГЛЮКОЗЫ (GLUT)

Транспортеры глюкозы (GLUT) переносят глюкозу через клеточные мембраны методом упрощенной диффузии. Поглощение глюкозы клеткой опосредовано GLUT, а метаболизм глюкозы – фосфорилированием глюкокиназой. GLUT4 – это инсулинозависимый переносчик глюкозы, который обнаружен в сердце, скелетных мышцах, жировой ткани и мозге, он присутствует в цитоплазме клеток в везикулах, из которых транслоцируется на плазматическую мембрану под действием инсулина (рис. 1). Такое инсулин-направленное рекрутирование GLUT4 приводит к 10–20-кратному увеличению транспорта глюкозы. Дефектная транслокация GLUT4 – признак инсулинорезистентности, важного предшественника СД2 [12].

2.1. Активаторы GLUT

Выявление изменений в поглощении сахара метаболически нарушенными клетками привело к разработке терапевтических подходов, направленных на транспорт глюкозы. Наряду с развитием диетотерапии были разработаны прямые методы модуляции переноса глюкозы в клетку [13]. Инсулин вызывает быструю транслокацию GLUT4 из везикул в плазматическую мембрану мышечной и жировой ткани [14]. Метформин снижает резистентность клеток к инсулину, индуцируя транслокацию GLUT4 [15]. Основные механизмы, лежащие в основе эффекта метформина на GLUT4-опосредованный транспорт глюкозы, представляют собой изменения в медиаторах сигнального пути инсулина, активацию AMPK, эпигенетические модификации и усиление транспорта через GLUT4 [16].

В настоящее время метформин – препарат первого выбора и наиболее часто используемое

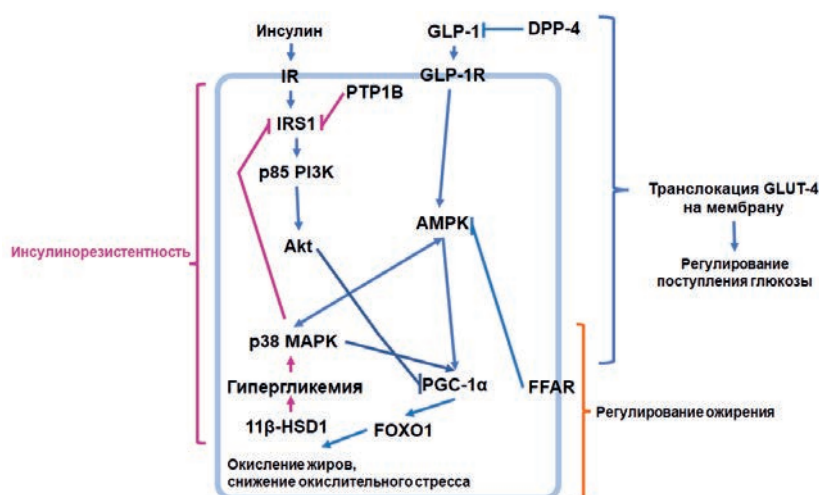


Рис. 1. Пути регулирования инсулинорезистентности, метаболизма жиров и глюкозы при СД2. Перспективными способами регулирования инсулинорезистентности считаются ингибирование 11β -HSD1, p38 MAPK, PTP1B, DPP-4, активация IRS1 и GLP-1R. Транслокации GLUT4 на поверхность мембраны способствует снижению инсулинорезистентности. Для активации окисления FFA и снижения окислительного стресса предлагается активация AMPK и PGC-1 α , повышение GLP-1 и GIP, уменьшение экспрессии FFAR.

противодиабетическое лекарственное средство. Первоначально метформин был получен из галегина, обнаруженного в лекарственном растении *Galega officinalis* [17]. Однако метформин в его эффективных дозах (500 или 1000 мг в сутки) часто вызывает побочные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта и противопоказан при нарушении функции почек [18]. Другие вещества из природных источников также демонстрируют способность активировать GLUT. Экстракт женьшеня (*Panax ginseng* C.A. Mey) усиливает экспрессию GLUT1 и GLUT4 в печени, мышцах и значительно снижает уровень глюкозы в крови натощак у людей с СД2, добавки с женьшенем в том числе приводили к снижению у людей с СД2 постпрандиального уровня глюкозы (наблюдаемого после приема пищи) [19]. Применение экстракта женьшеня в дозе 200 мг/кг в течение 12 недель у крыс с диабетом приводит к повышению экспрессии GLUT4, что, вероятнее всего, связано с содержанием сапонина гингенозида R1 в экстракте *Panax ginseng* (табл. 1). Водные экстракты листьев одуванчика *Taraxacum officinale* оказывают гипогликемическое действие у крыс с диабетом при хроническом введении экстракта в дозе 2.4 г/кг в течение 4 недель. Гипогликемическое действие экстракта связывают с содержанием

флавоноидов, фенольных соединений, сапонинов и полисахаридов [20]. Полифенолы экстракта корицы способствуют транслокации GLUT4 в клеточной культуре [21, 22]. Пептиды *Glycine max* IAVPGEVA, IAVPTGVA и LPYP в концентрации 500 мкМ при инкубации в течение 24 ч в культурах клеток печени усиливают поглощение глюкозы посредством активации GLUT1, GLUT4 и модулируют метаболизм глюкозы путем активации Akt и AMPK [23].

3. СУБСТРАТ ИНСУЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА 1 (IRS1)

Снижение уровня экспрессии мРНК IRS1 – один из основных патологических механизмов развития диабета. IRS1 играет жизненно важную роль в стимулируемом инсулином пути метаболизма глюкозы, а дефект его экспрессии приводит к нарушению метаболизма глюкозы за счет изменений в активности нижестоящих ферментов и киназ [24]. IRS1 – субстрат тирозинкиназы инсулинового рецептора, играющий центральную роль в пути передачи стимулируемого инсулином сигнала (рис. 1). Поэтому ген *IRS1* широко изучался как ген-кандидат в терапии СД2 [25]. IRS1 играет доминирующую роль в скелетных мышцах. Он имеет решающее значение для нормального

Таблица 1. Эффективность соединений из природных источников в отношении терапевтических мишеней для лечения СД2

Терапевтическая мишень и эффект	Природный источник	Активное вещество	Доза/количество/концентрация	Демонстрация эффективности	Ссылки
Активаторы GLUT	<i>Panax ginseng</i>	Гингенозид R1	200 мг/кг экстракта	В течение 12 недель у диабетических крыс	[19]
	<i>Taraxacum officinale</i>	Токоферолы, L-аскорбиновая кислота, каротиноиды	2.4 г/кг экстракта	В течение 4 недель у диабетических крыс	[20]
	<i>Cinnamotum burmannii</i>	Полифенолы	10 и 100 мкг/мл	На культуре клеток адипоцитов	[21, 22]
	<i>Glycine max</i>	Пептиды IAVPGEVA, IAVPTGVA, LPYP	500 мкМ	На культуре клеток печени в течение 24 ч	[23]
Активаторы IRS1	<i>Punica granatum</i>	Полифенолы	100, 200 и 350 мг/кг экстракта	В течение 21 недели у диабетических крыс	[29]
	<i>Gelidium elegans</i>	Полифенолы	50 и 200 мг/кг	В течение 5 недель у диабетических крыс	[29]
Ингибиторы PTP1β	<i>Cinnamomum verum</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> , корица китайская, вьетнамская и малабарская	Тримеры, тетрамеры, олигомеры и смеси мономеров процианидина	–	Культура фибробластов мыши	[21, 22]
	<i>Juniperus chinensis</i>	α-Метиларгофлаванокумарин	–	Молекулярный докинг	[33]
Регуляторы пути AMPK/ SIRT1/PGC-1α	<i>Panax ginseng</i>	Гингенозид Rg2	25 и 50 мкМ	На культуре клеток в течение 16 ч	[39]
	<i>Rhizome coptidis</i>	Берберин	100 мг/кг	В течение 7 дней у диабетических крыс	[40]
	Красный дрожжевой рис	Монасцин, анкафлавин	5 мг/кг	В течение 5 недель у диабетических мышей	[40]
	<i>Lespedeza bicolor</i>	Генистеин, кверцетин, даидзеин, катехин, лютеолин, нарингин	100 и 250 мг/кг экстракта	В течение 12 недель у диабетических мышей	[36]

Таблица 1. (Продолжение)

Терапевтическая мишень и эффект	Природный источник	Активное вещество	Доза/количество/концентрация	Демонстрация эффективности	Ссылки
Регуляторы пути Akt/Erk1/2/p38 MAPK	<i>Beta vulgaris</i>	Бетаин	1, 5 и 10 мкМ	В культуре клеток почек мышей	[41]
	<i>Gelidium elegans</i>	Полифенолы	200 мг/кг экстракта (1 г содержит 8.79 мг полифенолов)	Введение диабетическим мышам в течение 5 недель	[24]
Регуляторы пути PI3K/Akt/mTOR	<i>Coptis chinensis</i> Franch	Берберин	80, 120 и 180 мг/кг экстракта (3.6% берберина в экстракте)	Введение в течение 24 недель диабетическим крысам	[46]
	<i>Psidium guajava</i>	Флавоноиды, фенольные кислоты, тритерпены и сесквитерпены	1638 мг/кг экстракта	В течение 8 недель у диабетических мышей	[47]
Ингибиторы 11β- HSD1	<i>Momordica charantia</i>	Гоягликозиды, кугуацины и госясапонины	10, 30 и 50 мкл (0.38 г сухого экстракта на 0.5 мл раствора)	<i>in vitro</i>	[49]
	<i>Camellia sinensis</i>	Этерифицированная форма галловой кислоты (–)-эпигалло-катехина	50 мкл	<i>in vitro</i>	[50]
	<i>Lyxium chinense</i>	Бетаин	50 мг/кг	Введение в течение 3 недель диабетическим мышам	[54]
Ингибиторы FOXO1	<i>Polygonum cuspidatum, Vigne rouge</i>	Ресвератрол	1, 5 и 10 мг/кг	Введение в течение 30 дней диабетическим крысам	[53]
	<i>Undaria pinnatifida</i> и <i>Hijikia fusiformis</i>	Фукоксантин	Диета с содержанием 1.06 и 2.22% фукоксантина	Диабетические мыши	[55]

Таблица 1. (Продолжение)

Терапевтическая мишень и эффект	Природный источник	Активное вещество	Доза/количество/концентрация	Демонстрация эффективности	Ссылки
Блокаторы FFAR	<i>Anredera cordifolia</i> (Tenore) Steen.	1.35% флавоноидов и 1.031% витексина	25, 50 и 100 мг/кг	Введение в течение 3 недель диабетическим крысам	[59]
	<i>Pollen typhae</i>	Фракция флавоноидов: нарингенин, кемпферол, изораменитин, изораменитин-3-О-неогесперидозид, тифанеозид и др.	200 мг/кг фракции флавоноидов	Введение в течение 4 недель диабетическим крысам	[58]
Агонисты GLP-1 и GIP	<i>Agave tequilana</i> F.A.C. Weber	Фруктаны	10 г в течение всего курса	В течение 5 недель у диабетических мышей	[11]
Ингибиторы DPP-4	<i>Taraxacum officinale</i> , <i>Momordica charantia</i>	Хлорогеновая кислота, лютеолин и кверцетин, олеаноловая кислота	10% сухого экстракта в растворе	<i>in vitro</i>	[20]
	<i>Vitis vinifera</i> L.	Процианидины	–	На культуре клеток кишечника человека	[11]
	<i>Commiphora mukul</i> Engl. и <i>Terminalia arjuna</i>	–	200 мг/кг экстрактов	В течение 4 недель у диабетических крыс	[11]
	Козье молоко	Пептиды MNQPPQPL, SPTVMFPPQSVL, VMFPPQSVL, INNQLPYPY, AWPQYL, INNQLPYPY	–	<i>in vitro</i>	[10]
	Верблюжье молоко	Пептиды FLQY, FQLGASPY, ILDKEGIDY, ILELA, LLQLEAIR, LPVP, LQALHQQGQIV, MPVQA, SPVVVPF	–	<i>in vitro</i>	[10]

Таблица 1. (Продолжение)

Терапевтическая мишень и эффект	Природный источник	Активное вещество	Доза/количество/концентрация	Демонстрация эффективности	Ссылки
Ингибиторы SGLT2	<i>Malus domestica</i>	Флоризин, ипрафлоризин, канаглифлозин, дапаглифлозин, эртуглифлозин	3 мг/кг (ипрафлоризин), 100 мг/кг (флоризин)	В течение 4 недель у диабетических мышей	[66, 67]
	<i>Sophora flavescens</i>	Мааккиаин, вариабиллин и фор-мононетин	–	<i>in vitro</i>	[68]
	<i>Acer nikoense</i>	Ацерогенин А, ацерогенин В	–	<i>in vitro</i>	[68]
Ингибиторы α-гликозидаз	<i>Ishige okamurae</i>	Дифлоретогидроксикармалол	100 мг/кг	При однократном введении перед глюкозотолерантным тестом у диабетических мышей	[79]
	<i>Porphyrha</i> spp.	Пептиды GSKK, ELS	–	<i>in vitro</i> , молекулярный докинг	[80]
	<i>Heteractis magnifica</i>	Магнификамид	0.005 мг/кг	<i>in vitro</i> , при однократном введении перед глюкозотолерантным тестом у диабетических мышей	[82–84]
	<i>Morus alba</i>	Морусальбинс А–D, альбацин В, макроурин G, юна-нензин А, мулберрофуран G и K, альбанол В	–	Молекулярный докинг	[85]
	<i>Coriandrum sativum</i>	Линалоол	–	Молекулярный докинг	[85]
Ингибиторы GFAT	Черный рис <i>Oryza sativa</i>	Цианидин-3-О-глюкозид	–	Молекулярный докинг	[85]
	<i>Euphorbia thimifolia</i> Linn.	Космозин, кверцетин-3-галактозид, кверцитрин, корилагин, 1-О-галлоил-β-D-глюкоза, β-амирин, тараксерол	–	Молекулярный докинг	[85]

Таблица 1. (Окончание)

Терапевтическая мишень и эффект	Природный источник	Активное вещество	Доза/количество/концентрация	Демонстрация эффективности	Ссылки
Ингибиторы CCN3	<i>Polygonum cuspidatum, Vigne rouge</i>	Ресвератрол	0.1 мкМ	<i>in vitro</i> , в культуре адипоцитов диабетических мышей при его применении в течение 24 ч	[92, 93]
Активаторы PPAR-γ	<i>Curcuma longa</i>	Куркумин	50 мкМ	На культуре гепатоцитов крыс при инкубации в течение 24 ч	[99]
	<i>Punica granatum</i>	Полифенолы	300 мкл/день (0.35 ммоль полифенолов в одной дозе)	В течение 5 месяцев у диабетических мышей	[100]
Активаторы Nrf2	<i>Lyxium barbarum</i>	Куркумин, кверцетин, ксантогумол, сульфорафан, лакцистин, ресвератрол, рапамицин, коричный альдегид и полисахарид	100 мг/кг полисахаридов	При однократном введении в глюкозотолерантном тесте у мышей	[105]
	<i>Curcuma longa</i>	Куркумин	100 и 200 мг/кг	В течение 16 недель у диабетических крыс	[106]

роста и дифференцировки мышечных волокон, инсулинозависимого поглощения глюкозы и синтеза гликогена [26]. IRS1 сам по себе не обладает киназной активностью, но фосфорилируется после связывания с активированными рецепторами. IRS1 фосфорилируется по нескольким остаткам тирозина, которые служат сайтами стыковки для различных сигнальных молекул, каждая из которых затем инициирует отдельные сигнальные пути, которые способствуют усвоению инсулина [27]. Низкие уровни экспрессии и уровня белка IRS1 связаны с развитием резистентности к инсулину и СД2 у людей и мышей, гетерозиготных по нулевым аллелям IR и IRS1. Следовательно, IRS1 – важная мишень в терапии инсулинорезистентности при СД2 [28].

3.1. Активаторы IRS1

Сообщается о биологической активности экстракта кожуры граната *Punica granatum* как антиоксиданта у крыс с экспериментальным сахарным диабетом, у которых наблюдались заметные увеличения экспрессии уровня мРНК IRS1 при приеме водного экстракта кожуры граната в дозах 100, 200 и 350 мг/кг в течение 21 недели (табл. 1). Можно предположить, что гипогликемические эффекты могут быть усилены за счет восстановления транскрипции IRS1 в печени на фоне диабета. Экстракт *Gelidium elegans* помимо воды, углеводов и белка имеет высокое содержание полифенолов: 8.79 мг на 1 г водоросли. Полифенолы в составе экстракта *G. elegans*, применяемые для мышей с диабетом в дозах 50 и 200 мг/кг, активируют сигнальный путь инсулина через IRS1 и фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), а также с помощью увеличения уровня экспрессии GLUT4. Параллельно активность митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) выявлена у крыс с сахарным диабетом, получавших перорально экстракт *G. elegans* в дозе 200 мг/кг в день в течение 5 недель [29].

4. ПРОТЕИНТИРОЗИНФОСФАТАЗА 1 β (PTP1 β)

Передача сигналов через инсулиновый рецептор зависит от баланса между фосфорилированием остатков тирозина протеинтирозинкиназами и дефосфорилированием остатков тирозина протеин-

тирозинфосфатазами. PTP1 β дефосфорилирует как инсулиновый рецептор, так и субстрат инсулинового рецептора и служит, таким образом, отрицательным регулятором инсулиновой сигнализации (рис. 1) [30, 31]. Поэтому повышенная экспрессия PTP1 β приводит к развитию инсулинорезистентности и снижению толерантности к глюкозе [32].

4.1. Ингибиторы PTP1 β

В клинических исследованиях сообщается о неблагоприятных исходах применения ингибиторов PTP1 β , что привело к их исключению из II фазы испытаний [32]. Ведутся поиски ингибиторов PTP1 β в природных источниках. Корица (*Cinnamomum verum*, *Cinnamomum zeylanicum*, а также корица китайская, вьетнамская и малабарская) содержит большое разнообразие активных молекул в листьях (эвгенол и фенольные соединения – рутин, катехины, кверцетин, кемпферол, изорамнетин), коре (коричный альдегид, коричный спирт, коричная кислота и фенольные соединения – процианидины, МНСР15, катехины), камфору в корнях, а также *транс*-циннамилацетат в плодах и циннамилацетат в цветах. Структуры фракции полифенолов корицы *C. burmannii*, очищенной методом ВЭЖХ, представляют собой тримеры, тетрамеры, олигомеры и смеси мономеров процианидина. Фракция полифенолов из корицы имитирует инсулин, повышает чувствительность к инсулину за счет ингибирования PTP1 β . Водорастворимая фракция полифенолов из корицы ингибирует тирозинфосфатазу, ингибирует дефосфорилирование и активирует фосфорилирование рецепторов инсулина в клеточной культуре фибробластов мыши (табл. 1) [21, 22]. α -Метилартофлаванокумарин из можжевельника *Juniperus chinensis* высокоэффективно ингибирует PTP1 β и может связываться с каталитическими и аллостерическими сайтами PTP1 β при проведении молекулярного докинга. Кроме того, α -метилартофлаванокумарин значительно увеличивает поглощение глюкозы и уменьшает экспрессию PTP1 β в культуре инсулинорезистентных клеток печени, подавляет фосфорилирование IRS1 и дозозависимо повышает уровни белка IRS1, киназ PI3K и Erk1 [33].

5. ПУТЬ AMPK/SIRT1/PGC-1 α

5'-Аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа (AMPK) и сиртуин 1 (SIRT1) напрямую влияют на экспрессию транскрипционного коактиватора рецептора γ , активирующего пролифератор пероксисомы 1 (PGC-1 α). PGC-1 α посредством AMPK и SIRT1 играет важную роль в регуляции энергетического гомеостаза в различных тканях, включая скелетные мышцы. Снижение энергетического запаса клетки приводит к повышению экспрессии AMPK и SIRT1, что, в свою очередь, активирует PGC-1 α [34]. AMPK активируется, когда АТФ быстро расходуется с образованием большого количества AMP. AMPK увеличивает активность SIRT1, что приводит к деацетилированию PGC-1 α (рис. 1). PGC-1 α связан с репликацией и биогенезом митохондрий. AMPK — одна из наиболее многообещающих мишеней как для профилактики, так и для лечения СД2 [35]. При сахарном диабете снижение уровня SIRT3 вместе с PGC-1 α в скелетных мышцах может привести к митохондриальной дисфункции, усилению окислительного стресса и инсулинорезистентности. Сигнальный путь AMPK/PGC-1 α снижает инсулинорезистентность путем модуляции липогенеза в печени и синтеза жирных кислот. Следовательно, активация передачи сигналов инсулина вместе с путем, связанным с AMPK/SIRT/PGC-1 α , может быть терапевтическим механизмом для облегчения повреждения скелетных мышц при диабете [36].

PGC-1 α поддерживает энергетический гомеостаз и регулирует экспрессию генов инсулина и митохондриального биогенеза и, таким образом, предотвращает митохондриальную дисфункцию и метаболические нарушения, связанные с нарушением функции адипоцитов [36–38]. PGC-1 α — нижестоящий сенсор метаболических, гормональных и воспалительных сигнальных молекул. В состоянии голодания α -клетки поджелудочной железы синтезируют и высвобождают глюкагон для поддержания нормального уровня глюкозы в крови. Глюкагон связывается со своим рецептором, присутствующим на гепатоцитах, и впоследствии запускает процесс регулирования PGC-1 α . PGC-1 α может коактивировать несколько

факторов транскрипции, включая ядерный фактор гепатоцитов-4 α и фактор транскрипции, кодируемый геном *FOXO1* (FOXO1), и, следовательно, контролировать транскрипцию ферментов, регулирующих скорость глюконеогенеза. Однако после еды β -клетки поджелудочной железы синтезируют и выделяют инсулин, связывающийся с его рецептором, что запускает фосфорилирование Akt, которое, в свою очередь, ингибирует PGC-1 α . Это приводит к стимуляции синтеза гликогена и торможению глюконеогенеза в печени [36].

Активация AMPK в настоящее время признана многообещающей стратегией для лечения СД2. Так, метформин, один из наиболее широко назначаемых препаратов при СД2, обладает сильным антигипергликемическим эффектом, частично за счет увеличения экспрессии PGC-1 α через AMPK [36].

5.1. Регуляторы пути AMPK/SIRT1/PGC-1 α

Гинзенозид Rg2 из корня женьшеня *Panax ginseng* подавляет глюконеогенез в печени посредством сигнального пути AMPK/PGC-1 α при инкубации культур клеток HepG2, DU145, HCT116 с гинзенозидом в концентрации 25 или 50 мкМ в течение 4 ч (табл. 1) [39]. Берберин, выделенный из *Rhizome coptidis*, может увеличивать фосфорилирование AMPK и снижать экспрессию PGC-1 α при пероральном введении диабетическим крысам в течение 7 дней в дозе 100 мг/кг. Монасцин и анкафлавин, полученные из красного дрожжевого риса, при пероральном введении мышам с сахарным диабетом в течение 5 недель в дозе 5 мг/кг приводит к снижению накопления у мышей жирных кислот, что частично опосредовано активацией AMPK и последующим стимулированием окисления жирных кислот с помощью PGC-1 α [40]. Экстракт *Lespedeza bicolor* содержит множество антиоксидантных соединений (генистеин, кверцетин, даидзеин, катехин, лютеолин и нарингин), при введении экстракта в дозах 100 и 250 мг/кг в течение 12 недель диабетическим мышам наблюдается улучшение метаболизма в скелетных мышцах посредством регуляции пути AMPK/SIRT1/PGC-1 α [36].

6. ПУТЬ Akt/Erk1/2/p38 MAPK

Akt представляет собой серин/треониновую протеинкиназу, которая обладает антиапоптотическим действием и является одной из основных последующих мишеней сигнального пути PI3K. Инактивация Akt, ключевого регулятора жизнеспособности клеток, характерна для дегенеративных заболеваний и патологической гибели клеток, вызванной стрессом [41]. Нарушение передачи сигналов через Akt снижает поглощение глюкозы и транслокацию GLUT4, что приводит к развитию СД2 [24]. Сигнальный путь Erk1/2 также участвует в формировании диабетической нейропатии. p38 MAPK, который связан с инициацией апоптоза клеток и остановкой клеточного цикла, экспрессируется в гломерулярных мезангиальных клетках в условиях гипергликемии [41]. Erk1/2 активируются гормонами и факторами роста, участвуют в контроле клеточной пролиферации и дифференцировки путем стимуляции факторов транскрипции [42]. MAPK могут фосфорилировать большое количество протеинкиназ и факторов транскрипции, тем самым регулируя клеточное развитие, выживание и гибель. Активация передачи сигналов MAPK при стрессе обычно прекращается с помощью MAPK-фосфатаз и тирозинфосфатаз [42]. Гипергликемия может привести к нарушению инсулиновой сигнализации за счет активации каскада MAPK. MAPK фосфорилирует IRS1, основную мишень инсулинового сигнального каскада, что приводит к нарушению активности нижестоящих компонентов инсулиновой сигнализации (рис. 1) [43].

6.1. Регуляторы пути Akt/Erk1/2/p38 MAPK

Бетаин из свеклы *Beta vulgaris* уменьшает фосфорилирование Akt, Erk1/2, p38 MAPK в количестве 1, 5 и 10 мкМ в культуре клеток почек мышей, но усиливает его в условиях гипергликемии (табл. 1) [41]. *Gelidium elegans* – красная водоросль, произрастающая в Азиатско-Тихоокеанском регионе, – содержит 8.79 мг полифенолов на 1 г водоросли, а также другие компоненты: углеводы (47.6%), белок (16.9%), влагу (5.1%) и золу (24.1%). Введение водного экстракта диабетическим мышам в дозе 200 мг/кг в течение 5 недель замедляет

увеличение массы тела и повышение уровня глюкозы в крови, потенциально за счет активации GLUT4 и Akt, а также блокирования пути MAPK [24].

7. ПУТЬ ФОСФОИНОЗИТИД-3-КИНАЗА (PI3K)/ПРОТЕИНКИНАЗА В (Akt)/МИШЕНЬ ПУТИ РАПАМИЦИНА (mTOR)

Путь PI3K/Akt/mTOR у млекопитающих играет жизненно важную роль в развитии широкого спектра патологических расстройств, в том числе диабета и рака. Инсулин в основном связывается с α -субъединицей инсулиновых рецепторов в печени, скелетных мышцах и жировой ткани, тем самым активируя фосфорилирование IRS1. Фосфорилированный IRS1 связывается с p85, регуляторной субъединицей PI3K, что, в свою очередь, приводит к фосфорилированию Akt и киназы гликогенсинтазы 3 (GSK3) и далее влияет на метаболизм глюкозы путем регулирования синтеза гликогена, глюконеогенеза и транспорта глюкозы (рис. 1). Таким образом, фармакологическое регулирование пути PI3K/Akt/mTOR – перспективная терапевтическая стратегия [44, 45].

7.1. Регулирование пути PI3K/Akt/mTOR

Берберин, извлеченный из этанольного экстракта *Coptis chinensis* Franch, увеличивает инсулин-индуцированное фосфорилирование тирозина IRS1 и рекрутирование p85 в IRS1, а также, вероятно, снижает инсулинорезистентность за счет регулирования пути PI3K/Akt. Экстракт *C. chinensis*, содержащий 3.6% берберина, вводимый перорально крысам с диабетом в дозах 80, 120 и 180 мг/кг в течение 24 недель, приводит к снижению гликированного гемоглобина, глюкозы в крови, холестерина и аполипопротеина A1 (табл. 1) [46]. Экстракт листьев *Psidium guajava* предположительно оказывает антигипергликемический эффект посредством активации сигнального пути PI3K/Akt. Этот эффект связывают с наличием в экстракте флавоноидов, фенольных кислот, тритерпенов и сесквитерпенов. Экстракт *Psidium guajava* получен путем высушивания листьев и замачивания в дистиллированной воде, его перорально вводили мышам с диабетом в дозе

1638 мг/кг в течение 8 недель, в результате нормализовался липидный обмен и снизилась инсулинорезистентность [47]. Серицин, водорастворимый белок кокона тутового шелкопряда, повышает экспрессию IR, IRS1, PI3K и Akt в печени диабетических крыс при его пероральном введении в дозах 2.4 и 1.8 мг/кг в течение 35 дней [45].

8. 11 β -ГИДРОКСИСТЕРОИДДЕГИДРОГЕНАЗА (11 β -HSD1)

В качестве перспективной мишени для терапии СД2 рассматривается фермент 11 β -HSD1, который катализирует превращение неактивного кортизона в активный кортизол [48]. 11 β -HSD1 действует как внутриклеточный переключатель, регулирующий действие глюкокортикоидов. Множество исследований, проведенных в последние десятилетия, подтверждает этиологическую роль 11 β -HSD1 при ожирении и СД2 (рис. 1). У мышей с дефицитом 11 β -HSD1 наблюдаются повышенная восприимчивость к глюкозе, снижение инсулинорезистентности и глюконеогенеза, улучшение липидного обмена [49]. Таким образом, ингибирование 11 β -HSD1 – многообещающая противодиабетическая стратегия.

8.1. Ингибиторы 11 β -HSD1

Экстракт плодов *Momordica charantia* в объемах 10, 30 и 50 мкл с концентрацией сухого экстракта 0.38 г на 0.5 мл DMSO приводит к дозозависимому снижению выхода кортизола из субстрата кортизона *in vitro*, что опосредовано ингибированием 11 β -HSD1. Эффективность экстракта *M. charantia*, вероятно, обусловлена голягликозидами, кугуацинами и голясапонинами, которые содержатся в плодах *M. charantia* (табл. 1) [49]. Водный экстракт зеленого чая *Camellia sinensis* имеет более высокую ингибиторную активность 11 β -HSD1 по сравнению с экстрактами других видов чая. Экстракт получают путем вымачивания 1 г чая в 10 мл воды в течение 90 мин. Ингибиторная активность экстракта *C. sinensis* по отношению к 11 β -HSD1 обнаруживается *in vitro* при добавлении в субстрат 50 мкл чайного экстракта, что связывают с наличием фенольных соединений. Этерифицированная форма галловой кислоты (–)-эпигаллокатехина из зеленого чая –

наиболее сильнодействующий природный ингибитор 11 β -HSD1 [50].

9. FOXO1 (ФАКТОР ТРАНСКРИПЦИИ, КОДИРУЕМЫЙ ГЕНОМ *FOXO1*)

В поджелудочной железе FOXO1 ответствен за дисфункцию β -клеток, активация FoxO1 индуцирует стресс и апоптоз панкреатических клеток. FOXO1 представляет собой фактор транскрипции, который активируется через пути MAPK, Akt и Pdx1 [51]. FOXO1 также активируется в печени во время состояний, подобных окислительному стрессу, и увеличивает активацию множества генов глюконеогенеза (рис. 1) [52]. Во время ингибирования гена FOXO1 у трансгенных мышей снижалась инсулинорезистентность в жировой ткани и уменьшалась концентрация глюкозы в крови при проведении глюкозотолерантного перорального теста. Кроме того, экспрессия FOXO1 увеличивается у крыс с СД2. Можно сделать вывод, что инсулинорезистентность можно снизить, воздействуя на экспрессию FOXO1 в жировой ткани. FOXO1 – перспективная мишень в контроле развития ожирения и развития инсулинорезистентности при СД2 [53].

9.1. Ингибиторы FOXO1

Бетаин, извлеченный из *Lycium chinense*, ингибирует активность FOXO1 и способствует снижению окислительного стресса. Бетаин при пероральном введении диабетическим мышам в дозе 50 мг/кг в течение 3 недель снижает инсулинорезистентность путем ингибирования FOXO1 в печени (табл. 1) [54]. Аналогично ресвератрол, получаемый из *Polygonum cuspidatum*, красного винограда и красного вина, снижает экспрессию FOXO1 и приводит к снижению уровня глюкозы в крови и инсулинорезистентности. Ресвератрол при пероральном введении крысам при моделировании сахарного диабета в течение 30 дней в дозах 1, 5 и 10 мг/кг приводит к снижению инсулинорезистентности и уровня глюкозы, индукции экспрессии FOXO1 [53]. Фукоксантин – соединение из группы ксантофиллов, представляет собой природный коричневый пигмент, распространенный в водорослях *Undaria pinnatifida* и *Hijikia fusiformis*. Добавление 1.06 и 2.22% фуко-

ксантина в корм мышам с сахарным диабетом снижает образование свободных радикалов в почках, уровень TNF- α и лептина, а также массы жировой ткани [55].

10. FFA-РЕЦЕПТОРЫ (РЕЦЕПТОРЫ СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ)

FFA (свободные жирные кислоты) с различной длиной цепи активируют трансмембранные рецепторы, такие как FFA1, FFA2 и FFA3. FFA1 в значительной степени экспрессируются на β -клетках поджелудочной железы. Активация этих рецепторов также играет важную роль в повышении секреции инсулина (рис. 1). Tang et al. показали, что активация рецепторов FFA2 и FFA3 на β -клетках поджелудочной железы человека ингибирует секрецию инсулина [56]. У мышей с нокаутом FFA2 и FFA3 в β -клетках наблюдается значительное снижение концентрации глюкозы в крови при проведении перорального глюкозотолерантного теста на фоне моделирования СД2, а также повышение концентрации инсулина в плазме и снижение уровней неэтерифицированных свободных жирных кислот. Роль FFA2 и FFA3 в регуляции секреции инсулина более заметна при ожирении и СД2 [56, 57]. Повышенные уровни FFA вызывают потерю β -клеток поджелудочной железы и снижение секреции инсулина, что приводит к усугублению СД2 [58]. Таким образом, регулирование активности рецепторов FFA – один из способов снижения инсулинорезистентности при СД2.

10.1. Ингибиторы FFA-рецепторов

Имеются данные об эффективности экстракта листьев *Anredera cordifolia* (Tenore) Steen., которое предположительно опосредовано через FFA1-рецептор. Экстракт *A. cordifolia* содержит 1.35% флавоноидов и 1.031% витексина, который представляет собой производное апигенина. Различные дозы экстракта *A. cordifolia* (25, 50 и 100 мг/кг) при введении перорально в течение 3 недель значительно снижают уровень глюкозы в крови у крыс с сахарным диабетом, аналогично глибенкламиду, производному сульфонилмочевины (табл. 1) [59]. Свободные жирные кислоты способствуют развитию инсулинорезистентности,

что опосредовано нарушением сигнализации через β -аррестин-2. Обнаружено, что фракция флавоноидов (нарингенин, кемпферол, изорамнетин, изорамнетин-3-*O*-неогесперидозид, тифанеозид и др.), выделенная из *Pollen typhae*, вводимая перорально в течение 4 недель в дозе 0.2 г/кг диабетическим крысам, снижает инсулинорезистентность посредством влияния на FFA-рецепторы [58].

11. ГЛЮКАГОНОПОДОБНЫЙ ПЕПТИД-1 (GLP-1) И ГЛЮКОЗОЗАВИСИМЫЙ ИНСУЛИНОТРОПНЫЙ ПОЛИПЕПТИД (GIP)

GLP-1 – один из инкретиновых гормонов, который секретируется L-клетками в дистальном отделе подвздошной кишки и толстой кишке. GLP-1 высвобождается после приема пищи и обнаруживается в жировой ткани. GLP-1 задерживает опорожнение желудка, увеличивает секрецию инсулина и снижает секрецию глюкагона. GLP-1 и GIP способствуют глюкозозависимой секреции инсулина аддитивным образом (рис. 1). Секреция инсулина может быть косвенно усилена с помощью ингибиторов дипептидилпептидазы-4 (DPP-4), которые снижают деградацию эндогенных инкретинов и приводят к повышению концентрации циркулирующих биологически интактных форм GLP-1 и GIP [60].

GLP-1 – один из наиболее эффективных препаратов для лечения СД2. GLP-1 увеличивает секрецию инсулина β -клетками поджелудочной железы и уменьшает высвобождение глюкагона из α -клеток поджелудочной железы. Кроме того, GLP-1 может стимулировать пролиферацию β -клеток поджелудочной железы и замедлять прогрессирование СД2. Однако применение GLP-1 затруднено из-за короткого периода полураспада в крови (<2 мин) благодаря протеиназной активности DPP-4 в отношении к GLP-1 [61, 62].

11.1. Агонисты GLP-1 и GIP

Предпринято много попыток разработать агонисты рецептора GLP-1. В последние годы эксенатид, лираглутид и семаглутид привлекли значительное внимание в лечении СД2. По сравнению с нативным GLP-1, эти агонисты устойчивы к

деградации DPP-4 и имеют более длительный период полувыведения из плазмы. Как и нативный GLP-1, агонисты связываются с рецепторами GLP-1, экспрессируемыми на β -клетках поджелудочной железы, и индуцируют секрецию инсулина глюкозозависимым образом [61]. Муджаро (тирзепатид) – “первый в своем классе” инъекционный препарат, который активирует как экспрессию GIP, так и GLP-1 [23].

Фруктаны из *Agave tequilana* F.A.C. Weber активируют рецепторы GLP-1 у диабетических мышей при потреблении 10 г в течение 5 недель, что проявляется в улучшении липидного и углеводного метаболизма и увеличении концентрации проглюкагонового пептида (табл. 1) [11]. Один из наиболее перспективных агонистов рецепторов GLP-1, используемых в настоящее время для лечения диабета, – это экседин-4. Он был получен из яда *Heloderma suspectum* и одобрен FDA в 2005 г. в качестве лекарственного средства при СД2. Эксенатид представляет собой более мощную синтетическую версию экседина-4 [10].

11.2. Ингибиторы DPP-4

DPP-4 разрушает инкретиновые гормоны GLP-1 и GIP, тем самым подавляя глюкозозависимую секрецию инсулина поджелудочной железой (рис. 1). Следовательно, ингибирование DPP-4 продлевает активность инкретиновых гормонов и их агонистов, что позволяет регулировать постпрандиальный уровень глюкозы [20].

Экстракты одуванчика *Taraxacum officinale* проявляют *in vitro* высокую ингибирующую активность DPP-4 в связи с содержанием в составе хлорогеновой кислоты, лютеолина и кверцетина. Присутствие олеаноловой кислоты в экстракте *Momordica charantia* способствует умеренной ингибирующей активности DPP-4 *in vitro* [20]. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что процианидины из экстракта семян *Vitis vinifera* L. приводят к снижению уровня DPP-4 и экспрессии его гена в клетках кишечника человека. Экстракты *Commiphora mukul* Engl. и *Terminalia arjuna* при введении перорально в дозе 200 мг/кг в течение 4 недель диабетическим крысам вызывают гипогликемический эффект, опосредованный инги-

бированием DPP-4 [11]. В казеине козьего молока, обработанного трипсином и химотрипсином, идентифицированы новые пептиды, ингибирующие DPP-4. Из пяти новых идентифицированных пептидов – MNQPPQPL, SPTVMFPPQSVL, VMFPPQSVL, INNQFLPYPY и AWPQYL – пептид INNQFLPYPY проявляет наибольшую ингибирующую активность с $IC_{50} = 40.08$ мкМ. Расщепленные трипсином белки верблюжьего молока продуцируют пептиды FLQY, FQLGASPY, ILDKEGIDY, ILELA, LLQLEAIR, LPVP, LQALHQQGQIV, MPVQA и SPVVVF, которые успешно ингибируют DPP-4 [10]. Пептиды, ингибирующие DPP-4, часто характеризуются высоким содержанием гидрофобных аминокислот, таких как аланин, глицин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, пролин, метионин, триптофан и валин. Например, взаимодействия между DPP-4 и пептидами фасоли KTYGL и AKSPLF заключаются в основном в H-, гидрофобных, полярных и катионных π -связях [23].

12. НАТРИЙ-ГЛЮКОЗНЫЙ КОТРАНСПОРТЕР ТИПА 2 (SGLT2)

Несмотря на значительные колебания ежедневного поступления глюкозы и потребности организма в ней, гомеостатические механизмы поддерживают уровень глюкозы в плазме в узком диапазоне, со средним уровнем ~ 4–5 мМ в течение суток. Реабсорбция глюкозы в клубочковый фильтрат – основной механизм, с помощью которого почки влияют на гомеостаз глюкозы. У людей без сахарного диабета концентрация глюкозы в моче очень мала или же глюкоза в моче полностью отсутствует [63]. SGLT2 отвечает за реабсорбцию глюкозы в сегментах 1 и 2 проксимальных канальцев, при этом он реабсорбирует >90% глюкозы. SGLT1 реабсорбирует остаточную глюкозу в сегменте 3 проксимальных канальцев. У мышей, нокаутированных по SGLT2, SGLT1 компенсировал и реабсорбировал до 35% отфильтрованной глюкозы [64]. Скорость почечной реабсорбции глюкозы повышена у людей с СД2 на 20–40%, что опосредовано повышением экспрессии SGLT2 [63]. Активность SGLT связана с котранспортом натрия и глюкозы, который осуществляется за счет Na/K-АТФазы, что облег-

чает перенос глюкозы против внутриклеточного градиента. SGLT2 представляет собой основную терапевтическую мишень при СД2 [64].

12.1. Ингибиторы SGLT2

Ингибиторы SGLT2 могут изменять экспрессию IL-6, адипонектина и сывороточного лептина и улучшать функцию жировой ткани, повышать уровни липопротеинов низкой и высокой плотности и снижать уровень триглицеридов [65]. Эти препараты действуют независимо от инсулина, однако применение ингибиторов SGLT приводит к риску возникновения кетоацидоза [64]. Флавоноид флоризин, который можно выделить из коры яблони *Malus domestica*, обладает ингибирующей активностью в отношении SGLT1 и SGLT2. Этот эффект был продемонстрирован и для производного флоризина, ипрафлоризина, который вводили диабетическим мышам в течение 4 недель в дозе 3 мг/кг, в то время как флоризин проявлял свою эффективность в более высокой дозе – 100 мг/кг (табл. 1). Производные флоризина, такие как канаглифлозин, дапаглифлозин, эмпаглифлозин, ипраглифлозин и эртуглифлозин, уже одобрены FDA для лечения СД2 [66, 67]. Серглифлозин, дапаглифлозин и некоторые тиогликозиды в настоящее время находятся в стадии разработки из этого класса препаратов [9]. Три соединения со структурой на основе изофлавоноидов, а именно мааккиаин, вариабалин и формонетин из экстракта *Sophora flavescens*, обладают мощной ингибирующей активностью *in vitro* в отношении SGLT2, но не SGLT1. Это предположительно связано с наличием гидроксильной функциональной группы в изофлавоноидах. Соединения, выделенные из коры *Acer nikoense*, два циклических диарилгептаноида, ацерогенин А и В, продемонстрировали ингибирование как SGLT1, так и SGLT2 *in vitro* [68].

13. α -ГЛИКОЗИДАЗЫ

α -Амилаза представляет собой фермент, который может гидролизовать α -D-(1,4)-гликозидные связи в крахмале или полисахаридах. Крахмал и полисахариды должны быть гидролизованы до дисахаридов и олигосахаридов, которые затем

гидролизуются α -гликозидазой до моносахаридов и только тогда всасываются в портальную вену печени через тонкий кишечник, что приводит к повышению концентрации глюкозы в крови после приема пищи [69, 70].

13.1. Ингибиторы α -гликозидаз

Действие ингибиторов α -гликозидаз заключается в замедлении расщепления и всасывания углеводов [69, 71]. Акарбоза, природный ингибитор α -гликозидаз, была обнаружена у бактерий рода *Actinoplanes* [72]. Акарбоза структурно похожа на природные олигосахариды, но имеет в 10^4 – 10^5 раз большее сродство к α -гликозидазам. Эффект α -гликозидаз заключается в снижении постпрандиального уровня глюкозы в крови. Поскольку снижение концентрации глюкозы в крови приводит к значительному снижению стимуляции синтеза и секреции инсулина, гиперинсулинемия также уменьшается [18, 73]. Кроме того, замедленное переваривание углеводов и расщепление олигосахаридов приводит к тому, что непереваренные углеводы достигают нижних отделов тонкой кишки и стимулируют секрецию GLP-1 (рис. 2) [69]. Поскольку GLP-1 задерживает опорожнение желудка, снижает секрецию глюкагона и регулирует секрецию инсулина, то становится объяснимым, почему длительное лечение акарбозой приводит не только к снижению постпрандиального уровня глюкозы, но и к снижению концентрации глюкозы натощак [74]. Большое разнообразие генов, кодирующих ингибиторы α -амилаз, обнаружено в геномах бактерий рода *Streptomyces* [75–78]. Дифлоретогидроксикармалол, выделенный из *Ishige okamurae*, обладает большим ингибирующим действием в отношении α -гликозидазы и α -амилазы по сравнению с акарбозой. Дифлоретогидроксикармалол при однократном введении перед глюкозотолерантным тестом в дозе 100 мг/кг проявляет более высокую ингибиторную активность по сравнению с акарбозой у мышей с сахарным диабетом (табл. 1) [79]. Admassu et al. выделили пептидные ингибиторы α -амилазы из высушенной водоросли *Porphyra* spp. – GGSK и ELS. Эти пептиды демонстрируют ингибиторную активность *in vitro* по отношению к

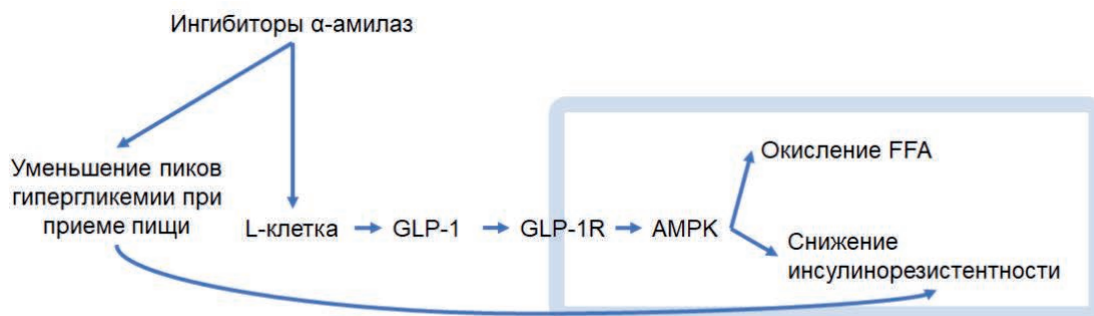


Рис. 2. Эффект ингибиторов α -амилаз при СД2. Ингибиторы α -амилаз не только снижают пиковую концентрацию глюкозы при приеме пищи, но и запускают механизмы регулирования инсулинорезистентности и метаболизма FFA через секрецию GLP-1, а также непосредственно через предотвращение гипергликемии.

α -амилазе, встраиваясь в аллостерический центр α -амилазы и ингибируя связывание фермента с полисахаридами [80]. Tysoe et al. впервые описали хелиантамид, высокоэффективный ингибитор панкреатической α -амилазы, который выделен из актинии *Stichodactyla helianthus*. Это первый представитель нового структурного класса ингибиторов гликозидаз. Однако в отличие от вышеперечисленных пептидов, хелиантамид связывается с активным сайтом α -амилазы и включает ингибиторный мотив YIYN [81]. В Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН выделили и охарактеризовали структуру магнификамида – пептида, обнаруженного в слизи морской анемоны *Heteractis magnifica*. Магнификамид ингибирует панкреатическую и слюнную α -амилазы млекопитающих *in vitro* эффективнее, чем акарбоза. Так же как и хелиантамид, магнификамид содержит ингибиторный мотив YIYN. Кроме того, магнификамид обладает устойчивостью в кислой среде желудка и при физиологических температурах предположительно из-за наличия трех дисульфидных связей, что делает доступным пероральное применение этого пептида [82–84].

Пептиды фасоли пинто – LSSLEMGS-LGALFVCM, PLPLHMLP, PPMHLP, PPHMGGP, PLPWGGAGF и PPHMLP – продемонстрировали превосходное ингибирование α -амилазы *in vitro* [23]. При гидролизе яичного белка с использо-

ванием алкалазы было получено восемь пептидов, среди которых RVPSLM и TPSPR проявили наибольшую ингибирующую активность в отношении α -гликозидазы [10]. С помощью молекулярного докинга установлено, что ингибирующую активность в отношении α -гликозидазы имеют производные халкона из коры корня *Morus alba*: морусальбинс А–D, альбацин В, макроурин G, юнанензин А, мулберрофуран G и К, альбанол В, а также линалоол, выделенный из плодов *Coriandrum sativum* [85].

14. ГЛУТАМИНФРУКТОЗО-6-ФОСФАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗА (GFAT)

GFAT – важная мишень, используемая в терапии СД2, т.к. он играет центральную роль в пути биосинтеза гексозамина и участвует в катализе первой и ограничивающей скорость стадии образования гексозамина [86]. GFAT катализирует образование глюкозамин-6-фосфата. Повышенная активность GFAT, по-видимому, связана с инсулинорезистентностью, постпрандиальной гипергликемией и окислительным стрессом при СД2. Недавние результаты показали, что гексозаминовый путь, регулируемый GFAT, ответственен за развитие сосудистых осложнений при СД2, особенно диабетической нефропатии. Следовательно, GFAT – многообещающая терапевтическая мишень для лечения СД2 и его осложнений [87].

14.1. Ингибиторы GFAT

Цианидин-3-*O*-глюкозид, содержащийся в черном рисе, обладает сильной антиоксидантной и антирадикальной активностью в отношении гидроксильных и супероксидных радикалов. Он уменьшает воспаление жировой ткани и стеатоз печени у диабетических крыс и тем самым снижает гипергликемию у мышей с диабетом. С использованием молекулярного докинга определено, что цианидин-3-*O*-глюкозид демонстрирует большую аффинность связывания с GFAT, чем нативный лиганд глюкозо-6-фосфат [85]. В растении *Euphorbia thimifolia* Linn. идентифицировано семь биологически активных соединений, которые проявляют высокую аффинность связывания с GFAT *in vitro*: космозин, кверцетин-3-галактозид, кверцитрин, корилагин, 1-*O*-галлоил- β -D-глюкоза, β -амирин и тараксерол [85].

15. CCN3, ИЛИ NOV (СВЕРХЭКСПРЕССИРУЕМЫЙ ГЕН НЕФРОБЛАСТОМЫ)

Недавно была открыта роль CCN3 как цитокина, играющего роль в метаболических нарушениях, связанных с ожирением и инсулинорезистентностью. *NOV* – ген, кодирующий CCN3. Концентрация CCN3 в плазме значительно повышена у пациентов с ожирением и гиперлипидемией, что коррелирует с повышением концентрации С-реактивного белка, индексом массы тела и массы висцерального жира. Блокирование CCN3 может предотвратить ожирение и повысить чувствительность тканей к инсулину, уменьшить воспаление в жировой ткани у диабетических мышей [88]. CCN3 – мишень для транскрипционного фактора FoxO1, являющегося важным медиатором передачи сигналов инсулина в β -клетках поджелудочной железы. CCN3 может ингибировать пролиферацию β -клеток, что приводит к снижению секреции инсулина в β -клетках поджелудочной железы. Таким образом, антагонисты CCN3 можно рассматривать как потенциальные препараты для лечения СД2 [89–91].

15.1. Ингибиторы CCN3

В связи с недавним открытием роли CCN3/NOV в развитии СД2 открывается возможность

поиска ингибиторов CCN3/NOV. Ресвератрол, природный нефлавоноидный полифенол, может улучшить усвоение глюкозы адипоцитами путем снижения инсулинорезистентности *in vitro* [92, 93], что позволяет предположить его потенциальное терапевтическое воздействие при СД. Ресвератрол увеличивает потребление глюкозы и экспрессию miR-23a-3p, адипонектина, лептина, PI3K и Akt, а также снижает экспрессию CCN3/NOV в культуре адипоцитов диабетических мышей при его применении в концентрации 0.1 мкМ в течение 24 ч (табл. 1) [94].

16. PPAR- γ (ГАММА-РЕЦЕПТОР, АКТИВИРУЕМЫЙ ПРОЛИФЕРАТОРОМ ПЕРОКСИСОМ)

PPAR представляют собой факторы транскрипции, принадлежащие к суперсемейству белков ядерных рецепторов и играющие решающую роль в контроле многих процессов в организме человека [94]. PPAR- γ связываются с различными эндогенными лигандами, жирными кислотами и эйкозаноидами и таким образом регулируют работу > 100 генов, поддерживающих метаболический гомеостаз в клетке [95]. Специфическое удаление PPAR- γ из клеток жировой ткани, мышц и макрофагов изменяет гомеостаз глюкозы. Эпигенетические модификации или посттрансляционные модификации в структуре PPAR- γ считаются многообещающими путями лечения различных метаболических заболеваний, в том числе СД2 [96]. При активации рецепторов PPAR- γ регулируется углеводный обмен и существенно повышается чувствительность к инсулину у тканей [97, 98].

16.1. Активаторы PPAR- γ

PPAR- γ – одна из важнейших ядерных мишеней для тиазолидиндионов. Однако тиазолидиндионы имеют ряд побочных эффектов, таких как сердечная недостаточность, увеличение веса, рак мочевого пузыря, увеличение объема плазмы [52, 94]. Куркумин из *Curcuma longa* проявляет противодиабетическую эффективность, аналогичную тиазолидиндиону. Дозозависимая регуляция куркумином PPAR- γ предотвращает рост гепатоцитов крыс за счет стимуляции клеточного цикла и ин-

дукции апоптоза: 24-часовая инкубация с 50 мкМ куркумина подавляет рост гепатоцитов на 63%. Предположительно, куркумин оказывает противовоспалительное действие *in vivo* за счет регуляции рецептора PPAR- γ , что приводит к снижению экспрессии провоспалительного медиатора NF- κ B [99]. Полифенолы из кожуры *Punica granatum* играют значительную роль в его гипогликемическом действии по нескольким путям, включая повышение чувствительности инсулиновых рецепторов, повышение активности PPAR- γ и уровня параоксоназы 1. Диабетические мыши при пероральном введении экстракта граната в течение 5 месяцев в объеме 300 мкл, который содержит 0.35 ммоль полифенолов, демонстрируют снижение массы тела, триацилглицеридов и холестерина на фоне повышения уровня параоксоназы 1 (табл. 1) [100].

17. Nrf2 (ЯДЕРНЫЙ ФАКТОР, СВЯЗАННЫЙ С ЭРИТРОИДНЫМ ФАКТОРОМ 2)

Nrf2 – главный регулятор окислительно-восстановительного гомеостаза. В ответ на стресс Nrf2 перемещается в ядро, где связывается с генами, содержащими антиоксидантный чувствительный элемент [101]. Эти гены кодируют белки, участвующие в реакции клетки на окислительный стресс, а также ферменты детоксикации и метаболические ферменты [102]. Таким образом, активация Nrf2 запускает экспрессию ферментов, которые непосредственно нейтрализуют активные формы кислорода, повышают клеточную антиоксидантную защиту, снижают уровень глюкозы в крови через запуск пентозофосфатного пути окисления глюкозы. Таким образом, активация Nrf2 – возможное решение проблемы окислительного стресса, связанного с гипергликемией [103, 104]. На ранних стадиях сахарного диабета уровень Nrf2 повышается, т.к. он действует в виде естественной защиты организма от гипергликемии. Однако адаптивный процесс, по-видимому, дает сбой на более поздних стадиях при хронической гипергликемии. Химическая или генетическая активация Nrf2 увеличивает чувствительность тканей к инсулину у диабетических мышей [105]. Таким образом, экзогенная активация сигнального пути Nrf2

может служить средством поддержки эндогенных антиоксидантных систем и предотвращения развития или прогрессирования СД2.

17.1. Активаторы Nrf2

Недавно было обнаружено, что метформин приводит к снижению инсулинорезистентности благодаря активации Nrf2 [103]. Куркумин, кверцетин, ксантогумол, сульфорафан, лакцистин, ресвератрол, рапамицин, коричный альдегид и полисахарид из *Lycium barbarum* активируют Nrf2 *in vitro* и *in vivo*. Полисахариды из *Lycium barbarum* в дозе 100 мг/кг на модели СД2 у мышей C57BL/6 проявляют гипогликемические свойства в глюкозотолерантном тесте, а также взаимодействуют с PI3K и Nrf2 в клеточных культурах в концентрациях 100–600 мкг/мл (табл. 1) [105]. Куркумин из *Curcuma longa* был идентифицирован как активатор Nrf2 и его нижестоящих мишеней. У крыс с диабетом куркумин в дозах 100 и 200 мг/кг, вводимый в течение 16 недель, активировал в печени Akt и Erk1/2, являющиеся вышестоящими киназами Nrf2 [106].

18. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В терапии СД2 наиболее распространены и эффективно используются природные соединения – полифенолы (в диапазонах доз 50–1638 мг/кг *in vivo*), в том числе флавоноиды растительных экстрактов, которые эффективны *in vitro* и *in vivo* в отношении PPAR- γ , PI3K/Akt/mTOR, Akt/Erk1/2/p38 MAPK, GLUT и в особенности IRS1 (полифенолы из граната и водоросли *Gelidium elegans* в дозах 50–350 мг/кг *in vivo*) и FFAR (флавоноиды в дозах 25 мг/кг – 200 мг/кг *in vivo*). Берберин (80, 100, 120 и 180 мг/кг *in vivo*) и бетаин (50 мг/кг *in vivo*), а также пигменты ресвератрол (1, 5 и 10 мг/кг *in vivo*) и фукоксантин (1.06 и 2.22% в корме лабораторных животных) показывают противодиабетическую активность в отношении сравнительно новых терапевтических мишеней для лечения СД2: FOXO1, CCN3, PI3K/Akt/mTOR, AMPK/SIRT1/PGC-1 α . Корица, женьшень и куркума – источники соединений, имеющих высокую активность в отношении PTP1 β , AMPK/SIRT1/PGC-1 α и Nrf2 при лечении СД2. Перспек-

тивными соединениями для лечения СД₂, которые на сегодняшний момент в большом объеме изучены *in silico*, являются пептиды из растительных экстрактов, молочных белков и ядов, которые активны в отношении GLUT, DPP-4 и α -гликозидаз.

Таким образом, научно-технические достижения позволяют трансформировать традиционную медицину в эффективный метод поиска лекарств на основе природных компонентов для лечения СД₂ [107–110].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20147).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Danaei G., Finucane M.M., Lu Y., Singh G.M., Cowan M.J., Paciorek C.J., Lin J.K., Farzadfar F., Khang Y.H., Stevens G.A., Rao M., Ali M.K., Riley L.M., Robinson C.A., Ezzati M. // *Lancet*. 2011. V. 378. P. 31–40.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)60679-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(11)60679-x)
2. Cho N.H., Shaw J.E., Karuranga S., Huang Y., da Rocha Fernandes J.D., Ohlrogge A.W., Malanda B. // *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2018. V. 138. P. 271–281.
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>
3. Artasensi A., Pedretti A., Vistoli G., Fumagalli L. // *Molecules*. 2020. V. 25. P. 1987.
<https://doi.org/10.3390/molecules25081987>
4. Moller D.E. // *Cell Metab.* 2012. V. 15. P. 19–24.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.10.012>
5. Maruthur N.M., Tseng E., Hutfless S., Wilson L.M., Suarez-Cuervo C., Berger Z., Chu Y., Iyoha E., Segal J.B., Bolen S. // *Ann. Intern. Med.* 2016. V. 164. P. 740–751.
<https://doi.org/10.7326/m15-2650>
6. Liu Z., Zhao X., Sun W., Wang Y., Liu S., Kang L. // *Exp. Ther. Med.* 2017. V. 13. P. 3137–3145.
<https://doi.org/10.3892/etm.2017.4333>
7. Wirngo F.E., Lambert M.N., Jeppesen P.B. // *Rev. Diabet. Stud.* 2016. V. 13. P. 113–131.
<https://doi.org/10.1900/rds.2016.13.113>
8. Wahab A. // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010. V. 3. P. 2090–2110.
<https://doi.org/10.3390/ph3072090>
9. Kanwal A., Kanwar N., Bharati S., Srivastava P., Singh S.P., Amar S. // *Biomedicines*. 2022. V. 10. P. 331.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10020331>
10. Antony P., Vijayan R. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 9059.
<https://doi.org/10.3390/ijms22169059>
11. Borah A.K., Ahmed S.A., Borah J.C. // *Phytomedicine Plus*. 2022. V. 2. P. 100225.
<https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100225>
12. Navale A.M., Paranjape A.N. // *Biophys. Rev.* 2016. V. 8. P. 5–9.
<https://doi.org/10.1007/s12551-015-0186-2>
13. Ismail A., Tanasova M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 8698.
<https://doi.org/10.3390/ijms23158698>
14. Konrad D., Bilan P.J., Nawaz Z., Sweeney G., Niu W., Liu Z., Antonescu C.N., Rudich A., Klip A. // *Diabetes*. 2002. V. 51. P. 2719–2726.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.51.9.2719>
15. Lee J.O., Lee S.K., Kim J.H., Kim N., You G.Y., Moon J.W., Kim S.J., Park S.H., Kim H.S. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 44121–44129.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.361386>
16. Herman R., Kravos N.A., Jensterle M., Janež A., Dolžan V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 1264.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031264>
17. Bailey C., Day C. // *Pract. Diabetes Int.* 2004. V. 21. P. 115–117.
<https://doi.org/10.1002/pdi.606>
18. Rosak C., Mertes G. // *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 2012. V. 5. P. 357–367.
<https://doi.org/10.2147/dmso.s28340>
19. Shishtar E., Sievenpiper J.L., Djedovic V., Cozma A.I., Ha V., Jayalath V.H., Jenkins D.J., Meija S.B., de Souza R.J., Jovanovski E., Vuksan V. // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e107391.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107391>
20. Kania-Dobrowolska M., Baraniak J. // *Foods*. 2022. V. 11. P. 2858.
<https://doi.org/10.3390/foods11182858>

21. Costello R.B., Dwyer J.T., Saldanha L., Bailey R.L., Merkel J., Wambogo E. // *J. Acad. Nutr. Diet.* 2016. V. 116. P. 1794–1802.
<https://doi.org/10.1016/j.jand.2016.07.015>
22. Sharma S., Mandal A., Kant R., Jachak S., Jagzape M. // *J. Pak. Med. Assoc.* 2020. Vol. 70. P. 2065–2069.
23. Hu K., Huang H., Li H., Wei Y., Yao C. // *Nutrients.* 2023. V. 15. P. 1096.
<https://doi.org/10.3390/nu15051096>
24. Choi J., Kim K.-J., Koh E.-J., Lee B.-Y. // *Nutrients.* 2018. V. 10. P. 51.
<https://doi.org/10.3390/nu10010051>
25. Kovacs P., Hanson R.L., Lee Y.-H., Yang X., Kobes S., Permana P.A., Bogardus C., Baier L.J. // *Diabetes.* 2003. V. 52. P. 3005–3009.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.52.12.3005>
26. Eckstein S.S., Weigert C., Lehmann R. // *Curr. Med. Chem.* 2017. V. 24. P. 1827–1852.
<https://doi.org/10.2174/0929867324666170426142826>
27. Chang Q., Li Y., White M.F., Fletcher J.A., Xiao S. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. P. 6035–6038.
28. Wang Y., Nishina P.M., Naggert J.K. // *J. Endocrinol.* 2009. V. 203. P. 65–74.
<https://doi.org/10.1677/JOE-09-0026>
29. Faddladdeen K.A.J. // *Folia Morphol. (Warsz).* 2021. V. 80. P. 149–157.
<https://doi.org/10.5603/FM.a2020.0034>
30. Shrivastava S.R., Shrivastava P.S., Ramasamy J. // *J. Diabetes Metab. Disord.* 2013. V. 12. P. 14.
<https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-14>
31. Stull A.J., Wang Z.Q., Zhang X.H., Yu Y., Johnson W.D., Cefalu W.T. // *Diabetes.* 2012. V. 61. P. 1415–1422.
<https://doi.org/10.2337/db11-0744>
32. Behl T., Gupta A., Sehgal A., Albarrati A., Albratty M., Meraya A.M., Najmi A., Bhatia S., Bungau S. // *Biomed. Pharmacother.* 2022. V. 153. P. 113405.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113405>
33. Jung H.J., Seong S.H., Ali M.Y., Min B.S., Jung H.A., Choi J.S. // *Arch. Pharm. Res.* 2017. V. 40. P. 1403–1413.
<https://doi.org/10.1007/s12272-017-0992-0>
34. Coughlan K.A., Valentine R.J., Ruderman N.B., Saha A.K. // *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 2014. V. 7. P. 241–253.
<https://doi.org/10.2147/DMSO.S43731>
35. Dugan L.L., You Y.H., Ali S.S., Diamond-Stanic M., Miyamoto S., DeClevés A.E., Andreyev A., Quach T., Ly S., Shekhtman G., Nguyen W., Chepetan A., Le T.P., Wang L., Xu M., Paik K.P., Fogo A., Viollet B., Murphy A., Brosius F., Naviaux R.K., Sharma K. // *J. Clin. Invest.* 2013. V. 123. P. 4888–4899.
<https://doi.org/10.1172/JCI66218>
36. Wu H., Deng X., Shi Y., Su Y., Wei J., Duan H. // *J. Endocrinol.* 2016. V. 229. P. R99–R115.
<https://doi.org/10.1530/JOE-16-0021>
37. Kleiner S., Mepani R.J., Laznik D., Ye L., Jurczak M.J., Jornayvaz F.R., Estall J.L., Chatterjee Bhowmick D., Shulman G.I., Spiegelman B.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 9635–9640.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1207287109>
38. Rius-Pérez S., Torres-Cuevas I., Millán I., Ortega Á.L., Pérez S. // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2020. V. 2020. P. 1452696.
<https://doi.org/10.1155/2020/1452696>
39. Kim M.J., Yun H., Kim D.H., Kang I., Choe W., Kim S.S., Ha J. // *J. Ginseng Res.* 2014. V. 38. P. 16–21.
<https://doi.org/10.1016/j.jgr.2013.11.010>
40. Hsu W.H., Chen T.H., Lee B.H., Hsu Y.W., Pan T.M. // *Food Chem. Toxicol.* 2014. V. 64. P. 94–103.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.015>
41. Li X., Wang L., Ma H. // *Mol. Med. Rep.* 2019. V. 20. P. 1754–1760.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10391>
42. Xu Z., Sun J., Tong Q., Lin Q., Qian L., Park Y., Zheng Y. // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. P. 2001.
<https://doi.org/10.3390/ijms17122001>
43. Kawano Y., Ryder J.W., Rincon J., Zierath J.R., Krook A., Wallberg-Henriksson H. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001. V. 281. P. E1255–E1259.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.281.6.e1255>
44. Huang X., Liu G., Guo J., Su Z. // *Int. J. Biol. Sci.* 2018. V. 14. P. 1483–1496.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.27173>
45. Song C., Liu D., Yang S., Cheng L., Xing E., Chen Z. // *Exp. Ther. Med.* 2018. V. 16. P. 3345–3352.
<https://doi.org/10.3892/etm.2018.6615>
46. Li J.C., Shen X.F., Shao J.A., Tao M.M., Gu J., Li J., Huang N. // *Drug Des. Devel. Ther.* 2018. V. 12. P. 2695–2706.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S171025>
47. Yang Q., Wen Y.M., Shen J., Chen M.M., Wen J.H., Li Z.M., Liang Y.Z., Xia N. // *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 2020. V. 13. P. 713–718.
<https://doi.org/10.2147/DMSO.S231979>

48. Cooper M.S., Stewart P.M. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2009. V. 94. P. 4645–4654.
<https://doi.org/10.1210/jc.2009-1412>
49. Blum A., Loerz C., Martin H.J., Staab-Weijnitz C.A., Maser E. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2012. V. 128. P. 51–55.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.09.003>
50. Hintzpeter J., Stapelfeld C., Loerz C., Martin H.-J., Maser E. // PLoS One. 2014. V. 9. P. e84468.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084468>
51. Damayanti D.S., Utomo D.H., Kusuma C. // In Silico Pharmacol. 2016. V. 5. P. 3.
<https://doi.org/10.1007/s40203-017-0023-3>
52. Kang S., Tsai L.T., Rosen E.D. // Trends Cell Biol. 2016. V. 26. P. 341–351.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.01.002>
53. Asadi S., Rahimi Z., Saidijam M., Shabab N., Godarzi M.T. // Int. J. Mol. Cell Med. 2018. V. 7. P. 176–184.
<https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.7.3.176>
54. Kim D.H., Kim S.M., Lee B., Lee E.K., Chung K.W., Moon K.M., An H.J., Kim K.M., Yu B.P., Chung H.Y. // J. Nutr. Biochem. 2017. V. 45 P. 104–114.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.04.014>
55. Marchelek-Mysliwiec M., Nalewajska M., Turoń-Skrzypińska A., Kotrych K., Dziedziejko V., Sulikowski T., Pawlik A. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 11611.
<https://doi.org/10.3390/ijms231911611>
56. Tang C., Ahmed K., Gille A., Lu S., Gröne H.J., Tunaru S., Offermanns S. // Nat. Med. 2015. V. 21. P. 173–177.
<https://doi.org/10.1038/nm.3779>
57. Prentice K.J., Wheeler M.B. // Cell Metab. 2015. V. 21. P. 353–354.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.02.015>
58. Feng X.T., Duan H.M., Li S.L. // Int. J. Mol. Med. 2017. V. 40. P. 922–930.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3070>
59. Dwitiyanti D., Harahap Y., Elya B., Bahtiar A. // Adv. Pharmacol. Pharm. Sci. 2021. V. 2021. P. 8869571.
<https://doi.org/10.1155/2021/8869571>
60. De León D.D., Crutchlow M.F., Ham J.Y., Stoffers D.A. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2006. V. 38. P. 845–859.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.07.011>
61. Li Y., Zhang W., Zhao R., Zhang X. // Bioact. Mater. 2022. V. 15. P. 392–408.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.02.025>
62. Seino Y., Fukushima M., Yabe D. // J. Diabetes Investig. 2010. V. 1. P. 8–23.
<https://doi.org/10.1111/j.2040-1124.2010.00022.x>
63. Chao E.C. // Clin. Diabetes. 2014. V. 32. P. 4–11.
<https://doi.org/10.2337/diaclin.32.1.4>
64. Saisho Y. // Diseases. 2020. V. 8. P. 14.
<https://doi.org/10.3390/diseases8020014>
65. Xu B., Li S., Kang B., Zhou J. // Cardiovasc. Diabetol. 2022. V. 21. P. 83.
<https://doi.org/10.1186/s12933-022-01512-w>
66. Moradi-Marjaneh R., Paseban M., Sahebkar A. // Phytother. Res. 2019. V. 33. P. 2518–2530.
<https://doi.org/10.1002/ptr.6421>
67. Anderson J.E. // Diabetes Spectr. 2020. V. 33. P. 165–174.
<https://doi.org/10.2337/ds19-0031>
68. Choi C.-I. // Molecules. 2016. V. 21. P. 1136.
<https://doi.org/10.3390/molecules21091136>
69. McCarty M.F., DiNicolantonio J.J. // Open Heart. 2015. V. 2. P. e000205.
<https://doi.org/10.1136/openhrt-2014-000205>
70. Taslimi P., Aslan H.E., Demir Y., Oztaskin N., Maraş A., Gulçin İ., Beydemir S., Goksu S. // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 119. P. 857–863.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.004>
71. Li H., Zhou H., Zhang J., Fu X., Ying Z., Liu X. // Int. J. Food Properties. 2021. V. 24. P. 277–290.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2021.1876087>
72. Brunkhorst C., Schneider E. // Res. Microbiol. 2005. V. 156. P. 851–857.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.03.008>
73. Rosak C., Mertes G. // Curr. Diabetes Rev. 2009. V. 5. P. 157–164.
<https://doi.org/10.2174/157339909788920910>
74. Dalsgaard N.B., Gasbjerg L.S., Hansen L.S., Hansen N.L., Stensen S., Hartmann B., Rehfeld J.F., Holst J.J., Vilsbøll T., Knop F.K. // Eur. J. Endocrinol. 2021. V. 184. P. 383–394.
<https://doi.org/10.1530/EJE-20-1121>
75. Hofmann O., Vértessy L., Braunitzer G. // Biol. Chem. Hoppe Seyler. 1985. V. 366. P. 1161–1168.
<https://doi.org/10.1515/bchm3.1985.366.2.1161>
76. Heyl D.L., Fernandes S., Khullar L., Stephens J., Blaney E., Opang-Owusu H., Stahelin B., Pasako T., Jacobs J., Bailey D., Brown D., Milletti M.C. // Bioorg. Med. Chem. 2005. V. 13. P. 4262–4268.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.019>

77. Ben Nejma M., Sioud O., Mastouri M. // 3 Biotech. 2018. V. 8. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s13205-017-1019-8>
78. Saxena L., Iyer B. K., Ananthanarayan L. // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2010. V. 878. P. 1549–1554.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.04.009>
79. Heo S.J., Hwang J.Y., Choi J.I., Han J.S., Kim H.J., Jeon Y.J. // Eur. J. Pharmacol. 2009. V. 615. P. 252–256.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.05.017>
80. Admassu H., Gasmalla M.A.A., Yang R., Zhao W. // J. Agricult. Food Chem. 2018. V. 66. P. 4872–4882.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00960>
81. Tysoe C., Williams L.K., Keyzers R., Nguyen N.T., Tarling C., Wicki J., Goddard-Borger E.D., Aguda A.H., Perry S., Foster L.J., Andersen R.J., Brayer G.D., Withers S.G. // ACS Cent Sci. 2016. V. 2. P. 154–161.
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.5b00399>
82. Sintsova O., Popkova D., Kalinovskii A., Rasin A., Borozdina N., Shaykhutdinova E., Klimovich A., Menshov A., Kim N., Anastyuk S., Kusaykin M., Dyachenko I., Gladkikh I., Leychenko E. // Biomed. Pharmacother. 2023. V. 168. P. 115743.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115743>
83. Sintsova O.V., Leychenko E.V., Gladkikh I.N., Anastyuk S.D., Monastyrnaya M.M., and Kozlovskaya E.P. // Vestnik of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences. 2018. V. 6S. P. 66.
<https://doi.org/10.25808/08697698.2018.202.6S.082>
84. Sintsova O., Gladkikh I., Kalinovskii A., Zelepuga E., Monastyrnaya M., Kim N., Shevchenko L., Peigneur S., Tytgat J., Kozlovskaya E., Leychenko E. // Marine Drugs. 2019. V. 17. P. 542.
<https://doi.org/10.3390/md17100542>
85. Bhuyan P., Sarma S., Ganguly M., Hazarika J., Mahanta R. // J. Mol. Structure. 2020. V. 1222. P. 128957.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128957>
86. Schleicher E.D., Weigert C. // Kidney Int. Suppl. 2000. V. 58. P. S13–S18.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.07703.x>
87. Srinivasan V., Sandhya N., Sampathkumar R., Farooq S., Mohan V., Balasubramanyam M. // Clin. Biochem. 2007. V. 40. P. 952–957.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.05.002>
88. Li J.Y., Wang Y.D., Qi X.Y., Ran L., Hong T., Yang J., Yan B., Liao Z.Z., Liu J.H., Xiao X.H. // Clin. Chim. Acta. 2019. V. 494. P. 52–57.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.03.006>
89. Peng L., Wei Y., Shao Y., Li Y., Liu N., Duan L. // Mediators Inflamm. 2021. V. 2021. P. 5576059.
<https://doi.org/10.1155/2021/5576059>
90. Paradis R., Lazar N., Antinozzi P., Perbal B., Buteau J. // PLoS One. 2013. V. 8. P. e64957.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064957>
91. Wang H., Huang B., Hou A., Xue L., Wang B., Chen J., Li M., Zhang J.V. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2021. V. 320. P. E786–E796.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00230.2020>
92. Wang P., Sang S. // Biofactors. 2018. V. 44. P. 16–25.
<https://doi.org/10.1002/biof.1410>
93. Xia N., Daiber A., Förstermann U., Li H. // Br. J. Pharmacol. 2017. V. 174. P. 1633–1646.
<https://doi.org/10.1111/bph.13492>
94. Zheng T., Chen H. // Mol. Immunol. 2021. V. 137. P. 163–173.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.06.011>
95. Frkic R.L., Richter K., Bruning J.B. // J. Biol. Chem. 2021. V. 297. P. 101030.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101030>
96. Rangwala S.M., Lazar M.A. // Trends Pharmacol. Sci. 2004. V. 25. P. 331–336.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.03.012>
97. Ma X., Wang D., Zhao W., Xu L. // Front. Endocrinol (Lausanne). 2018. V. 9. P. 473.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00473>
98. Александров А.А. // ПМЖ. 2011. Т. 13. С. 847.
99. Mazidi M., Karimi E., Meydani M., Ghayour-Mobarhan M., Ferns G.A. // World J. Methodol. 2016. V. 6. P. 112–127.
<https://doi.org/10.5662/wjm.v6.i1.112>
100. Balbaa M., El-Zeftawy M., Abdulmalek S.A. // Molecules. 2021. V. 26. P. 6836.
<https://doi.org/10.3390/molecules26226836>
101. Sireesh D., Dhamodharan U., Ezhilarasi K., Vijay V., Ramkumar K.M. // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 5126.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-22913-6>
102. Reis A.A. da S., Santos R. da S., Cruz A.H. da S., Silva E.G. da, Cruz A.D. da, Pedrino G.R. // InTech. 2016.
<https://doi.org/10.5772/66132>
103. Zamanian M.Y., Giménez-Llort L., Nikbakhtzadeh M., Kamiab Z., Heidari M., Bazmandegan G. // Curr. Mol. Pharmacol. 2023. V. 16. P. 331–345.
<https://doi.org/10.2174/1874467215666220620143655>

104. Cuadrado A., Manda G., Hassan A., Alcaraz M.J., Barbas C., Daiber A., Ghezzi P., León R., López M.G., Oliva B., Pajares M., Rojo A.I., Robledinos-Antón N., Valverde A.M., Guney E., Schmidt H.H.H.W. // *Pharmacol. Rev.* 2018. V. 70. P. 348–383.
<https://doi.org/10.1124/pr.117.014753>
105. Matzinger M., Fischhuber K., Heiss E.H. // *Biotechnol. Adv.* 2018. V. 36. P. 1738–1767.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.015>
106. Ghareghomi S., Rahban M., Moosavi-Movahedi Z., Habibi-Rezaei M., Saso L., Moosavi-Movahedi A.A. // *Molecules.* 2021. V. 26. P. 7658.
<https://doi.org/10.3390/molecules26247658>
107. Chang C.L., Lin Y., Bartolome A.P., Chen Y.C., Chiu S.C., Yang W.C. // *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2013. V. 2013. P. 378657.
<https://doi.org/10.1155/2013/378657>
108. Riyaphan J., Pham D.C., Leong M.K., Weng C.F. // *Biomolecules.* 2021. V. 11. P. 1877.
<https://doi.org/10.3390/biom11121877>
109. Agarwal P. // *Res. Rev. J. Med. Health Sci.* 2016. V. 5. P. 1–8.
110. Atanasov A.G., Zotchev S.B., Dirsch V.M., International Natural Product Sciences Taskforce, Supuran C.T. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021. V. 20. P. 200–216.
<https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>

Promising Directions for Regulating Signaling Pathways Involved in the Type 2 Diabetes Mellitus Development

N. A. Borozdina^{*, **, #}, I. A. Dyachenko^{*, **, #}, and D. V. Popkova^{***}

[#] Phone: +7 (977) 358-52-97; e-mail: borozdina@bibch.ru

^{*} Branch of the Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 6, Pushchino, 142290 Russia

^{**} Branch of the Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), prosp. Nauki 3, Pushchino, 142290 Russia

^{***} G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, prosp. 100 let Vladivostoku 159, Vladivostok, 690022 Russia

Many studies confirm that substances of natural origin have a pronounced affinity for type 2 diabetes mellitus (T2DM) therapeutic targets. At the moment, there is growing interest in bioactive peptides, phytochemicals, and drugs from other natural sources as highly effective, safe and promising antidiabetic agents. Natural sources are a promising resource for regulating several pathological pathways in T2DM. The review describes ways to mitigate insulin resistance and tissue sensitivity to glucose through PTP1 β (protein tyrosine phosphatase 1 β), GLP-1R (glucagon-like peptide receptor), DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4), AMPK (adenosine monophosphate activated protein kinase), MAPK (mitogen-activated protein kinase). Regulation of obesity and oxidative stress development through CCN3 (nephroblastoma overexpressed gene), PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), Nrf2 (nuclear factor erythroid-related factor 2), FFAR (free fatty acid receptors), 11 β -HSD1 (11 β -hydroxysteroid dehydrogenase). Regulation of hyperglycemia through alpha-amylase inhibitors, regulation of glucose metabolism through GFAT (glutamine fructose-6-phosphate aminotransferase), FOXO1 (forkhead box protein O1), GLUT4 (glucose transporter type 4), PGC-1 α (receptor gamma coactivator 1 α activating peroxisome proliferator). The review examines the use of natural sources, from which low-molecular-weight and peptide compounds are used as T2DM targets modulators.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, oxidative stress, hyperglycemia, insulin resistance



УДК 577.127

БИОХИМИЯ РЕДОКС-АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СЕРЫ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ПОДХОДЫ К ИХ ДЕТЕКЦИИ

© 2024 г. Р. И. Раевский*, **, В. А. Катруха*, ***, Ю. В. Храмова*, ***, #, Д. С. Билан*, **, #

* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины
РНИМУ им. Н.И. Пирогова,
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

*** Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, кафедра биохимии
биологического факультета,
Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1/12

Поступила в редакцию 02.12.2023 г.

После доработки 23.12.2023 г.

Принята к публикации 24.12.2023 г.

Открытие новых классов регуляторных молекул метаболизма человека и животных всегда приводит к широкомасштабному исследованию их биохимических, физиологических и фармакологических свойств. Одним из таких классов молекул около 20 лет назад стал сероводород (H_2S) и его производные – активные формы серы (АФС): персульфиды, полисульфиды, нитрозотиолы, сульфеновые кислоты и др. Было показано участие АФС во множестве физиологических и патологических процессов: регуляции тонуса сосудов, воспалении, долговременной потенциации в центральной нервной системе и т.д. Изменение уровней АФС или паттернов модификации их мишеней ассоциировано с широким спектром патологий: сердечно-сосудистых, онкологических, нейродегенеративных и др. Для части этих процессов изучены механизмы, которые связаны с прямой модификацией регуляторных (NF- κ B, Keap1) или эффекторных (GafD, eNOS, TRPA1) белков посредством реакций остатков цистеинов и металл-содержащих центров с АФС. Наличие разных регулируемых ферментативных систем, продуцирующих АФС, а также большое количество их молекулярных мишеней позволяют рассматривать H_2S и его производные в качестве важного класса малых регуляторных молекул. H_2S причисляют к классу так называемых “газотрансмиттеров” наряду с оксидом азота(II) и монооксидом углерода. За последние 20 лет накопился огромный массив данных о биохимии данных соединений и подходов к их изучению.

Ключевые слова: H_2S , полисульфиды, персульфиды, активные формы серы, персульфидация, методы детекции активных форм серы

DOI: 10.31857/S0132342324040065, **EDN:** MWZWVY

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	437
2. ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И МЕТАБОЛИЗМ АФС	437

Сокращения: АФА – активные формы азота; АФК – активные формы кислорода; АФС – активные формы серы; ЦБС – цистатионин- β -синтаза; ЦГЛ – γ -лиаза/цистатионаза; 3-МСТ – 3-меркаптопируватсульфотрансфераза; GSSH – персульфид глутатиона; А β – бета-амилоид.

Автор для связи: (эл. почта: d.s.bilan@gmail.com; yul.khramova@gmail.com).

3. ОСНОВНЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ И МИШЕНИ АФС	443
3.1. Влияние АФС на сердечно-сосудистую систему	444
3.2. Влияние АФС на нервную систему	446
3.3. Влияние АФС на эндокринную систему	447
3.4. Участие АФС в реакциях воспаления	448
4. ДЕТЕКЦИЯ АФС	449
4.1. Прямая детекция АФС	449
4.2. Методы прижизненной детекции АФС	449
4.3. Биохимические методы детекции АФС	451
4.4. Детекция АФС-опосредованных модификаций белков	452
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	454
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	455

1. ВВЕДЕНИЕ

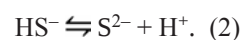
Около 20 лет назад исследователи внимательно начали рассматривать биологическую роль активных формы серы (АФС): сероводорода (H_2S) и его производных, главные из которых – полисульфиды, персульфиды, нитрозотиолы (рис. 1). Для этого класса соединений была показана сигнальная функция внутри клетки, что обусловлено реакционной способностью с большим количеством внутриклеточных мишеней [1–3].

За два десятилетия были выпущены сотни работ о биохимических, физиологических и потенциально терапевтических аспектах АФС, однако ввиду крайне широкой сферы участия данных соединений в функционировании организма по-прежнему остается множество белых пятен в этой области исследований [4–8]. Для АФС было показано вовлечение во множество глобальных процессов, например, в борьбу с окислительным стрессом, вызываемым различными биологически значимыми оксидантами, такими как супероксид анион-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), пероксид водорода (H_2O_2), хлорноватистая кислота (HOCl) и др. [9]. H_2S взаимодействует с реакционноспособными соединениями напрямую, снижая их концентрации, но также участвует в регуляции экспрессии некоторых генов, кодирующих белки антиоксидантных систем [10]. Одними из первых физиологических эффектов, показанных для H_2S , были кардиопротекторное [11] и вазодилатирующее действие [2, 12],

механизм которых до сих пор не до конца ясен. Также для АФС показано антиапоптотическое [13, 14] влияние на клетки, нелинейные концентрационные эффекты выявлены для анти- и провоспалительного действия АФС [15]. С различными изменениями в уровне внутриклеточных АФС ассоциируют большое количество патологических процессов: болезнь Гентингтона и Альцгеймера, ишемический инсульт, различные типы онкологических заболеваний, сепсис и многие другие [16–19].

2. ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И МЕТАБОЛИЗМ АФС

H_2S (сероводород) – токсичный газ с сильным неприятным запахом “тухлых яиц”, хорошо растворимый в воде и обладающий высокой способностью проникновения через липидный бислой. В водных растворах представляет слабую двухосновную кислоту (реакции (1) и (2)):



Значение pK_{a1} для первой реакции составляет 6.84 при 37°C [20], в то время как pK_{a2} при 25°C определено разными исследователями в диапазоне от 12.5 [21] до 19 [22]. При физиологических значениях pH (7.4) и 37°C соотношение форм HS^- и H_2S составляет ~4 : 1, при этом концентрация формы S^{2-} крайне мала (10^{-12} М) [23]. Далее в тексте под “ H_2S ” мы будем подразумевать как

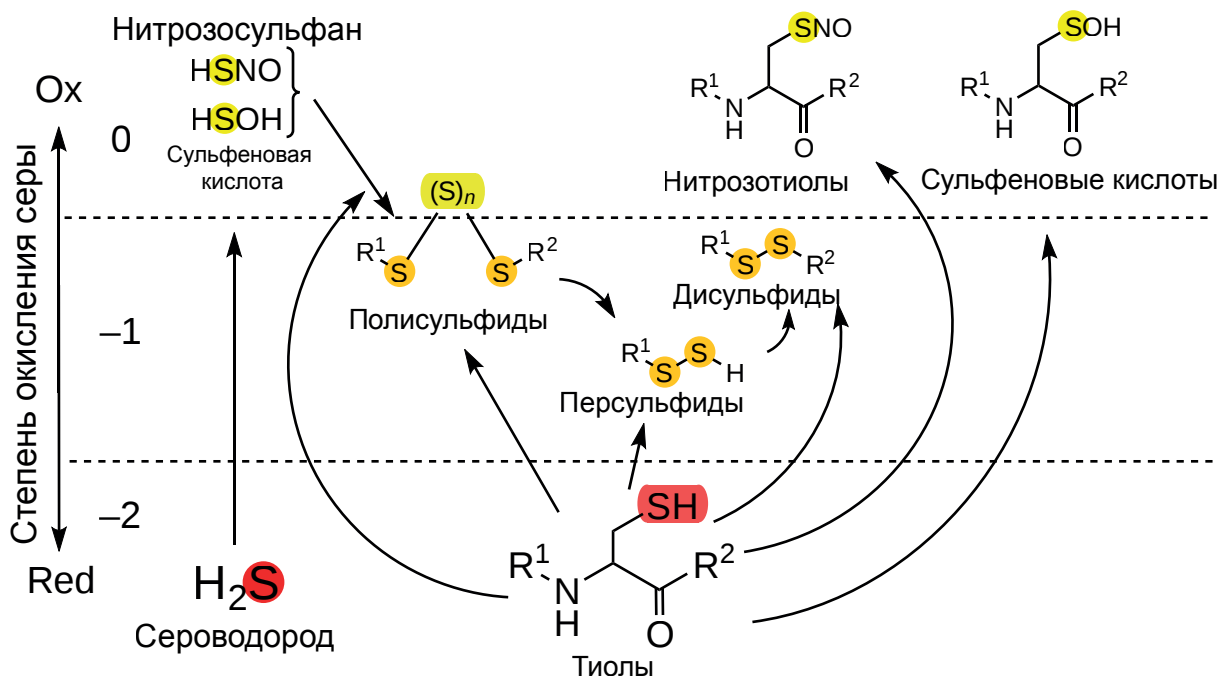
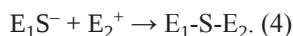
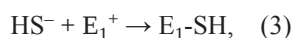


Рис. 1. Активные формы серы, упорядоченные по формальным степеням окисления атомов серы. Стрелками показаны генеалогические связи, обсуждаемыми далее в тексте.

непосредственно форму H_2S , так и HS^- . H_2S (особенно в форме HS^-) – сильный нуклеофил, это связано с локализованным отрицательным зарядом, высокой поляризуемостью и сравнительно низкой электроотрицательностью атома серы. Однако в отличие от тиолят-анионов, у которых “ RS^- ”-группа связана с углеродом, после первой реакции с электрофилом (реакция (3)), может вновь произойти реакция ионизации и последующее взаимодействие с другим электрофилом (реакция (4)):



Так, реакция H_2S с дисульфидами идет примерно на порядок медленнее, чем реакции соответствующих тиолов (тиол-дисульфидный обмен), что связано с более сильным положительным индуктивным эффектом, более высокой поляризуемостью и сольватационным эффектом последних [24]. В составе H_2S сера находится в степени окисления –2. В клетке H_2S – сильный двухэлектронный восстановитель, его окислительно-восстановительный (ОВ) потенциал E°

(HS_2^- , $\text{H}^+ / 2\text{HS}^-$) против водородного электрода составляет –0.23 В, что сопоставимо с ОВ-потенциалами цистеина и глутатиона [25]. Однако одноэлектронный ОВ-потенциал ($\text{S}^\cdot$, H^+ / HS^-) против водородного электрода равен +0.91 В [26], что сопоставимо с соответствующими значениями для тиолов ($E^\circ(\text{RS}^\cdot$, $\text{H}^+ / \text{RSH}) = +0.96$ В). Одноэлектронное окисление происходит эффективно из-за большой скорости дальнейших реакций образующегося сульфанил-радикала $\text{HS}^\cdot$, которые приводят к образованию персульфидов (H_2S_2) [27]. H_2S может окисляться до разных продуктов: сульфатов (SO_4^{2-}), сульфитов (SO_3^{2-}), тиосульфатов ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), полисульфидов (RSS_nSR) и элементарной серы (S_n) (рис. 1). В последнее время все больший интерес исследователей вызывает перекрестный (crosstalk) сигналинг, опосредованный H_2S и оксидом азота (NO) [28]. Взаимодействие H_2S с NO приводит к образованию стабильных нитрозотиолов (HS-NO) и нитроксидов (HNO), появляющихся в результате распада HS-NO [9]. HNO , как донор частицы NO^+ , обладает отличным от NO паттерном реакционной спо-

способности: так, нитроксил может напрямую реагировать с тиолами с образованием сульфинов и дисульфидов [29].

Сигналинг и паракринная регуляция с участием H_2S обусловлены его способностью проникать через мембрану благодаря высокому коэффициенту распределения гидрофобная фаза/вода. Проницаемость мембраны для сероводорода повышается в условиях более низкого значения pH [24]. Трансмембранный перенос H_2S осуществляется с высокой скоростью (11.9 см/с) и, по всей видимости, без участия транспортеров и каналов [30]. Благодаря высокой мембранной проницаемости и большому количеству потенциальных мишеней для взаимодействия, что определяет, как будет описано ниже, регуляцию физиологических эффектов, H_2S причисляют к важным сигнальным молекулам в группе газотрансмиттеров наряду с оксидом азота(II) и монооксидом углерода (CO) [31].

H_2S образуется в клетках человека и других млекопитающих благодаря работе нескольких ферментов, участвующих в метаболизме серосодержащих аминокислот: пиридоксаль-5-фосфат-зависимых цистатионин- β -синтазы (ЦБС, ЕС 4.2.1.22), цистатиониновой γ -лиазы/цистатиназы (ЦГЛ, ЕС 4.4.1.1) и пиридоксаль-независимой 3-меркаптопируватсульфотрансферазы (3-МСТ, ЕС 2.8.1.2) (рис. 2). Данные ферменты имеют различные профили тканевой экспрессии, отличаются по эффективности синтеза H_2S , субстратной специфичности и механизмам регуляции активности, что в совокупности позволяет тонко контролировать уровни внутриклеточного H_2S [32].

ЦБС проявляет наибольшую активность в тканях мозга, особенно в астроцитах [33], но также в эндотелии сосудов и плазме крови [34]. В качестве субстрата для синтеза H_2S этот фермент может использовать либо две молекулы цистеина, либо пару цистеин–гомоцистеин. ЦБС содержит регуляторный гем-содержащий домен, который способен взаимодействовать и с другими газотрансмиттерами NO или CO, что при этом значительно снижает ферментативную активность ЦБС и влияет на сигналинг [35]. Свя-

зывание S-аденозилметионина (SAM), метаболита метионина и одного из основных кофакторов метилирования, наоборот, увеличивает каталитическую активность ЦБС [36]. Однако одновременно с этим происходит увеличение аффинности гема к CO и NO, что ускоряет их связывание и ингибирование [36]. При окислительном стрессе наблюдается глутатионилирование ЦБС, эта модификация также приводит к увеличению активности фермента [37], что позволяет повысить продукцию цистеина и усилить синтез глутатиона в клетке.

ЦГЛ – фермент, который демонстрирует наибольшую H_2S -продуцирующую активность в сердце, печени, сосудах, плазме крови [38] и использует для синтеза H_2S в первую очередь гомоцистеин либо цистеин [39] (рис. 2). ЦГЛ увеличивает ферментативную активность в присутствии комплекса Ca^{2+} –кальмодулин [40]. В целом для ЦГЛ и ЦБС характерна субстратная неразборчивость (enzyme promiscuity), поскольку ферменты катализируют несколько реакций. По всей видимости, это связано с особенностями пиридоксаль-зависимого катализа. Большая часть реакций, катализируемых ЦГЛ и ЦБС, сопровождается выделением H_2S , однако в связи с высокими K_M для субстратов и низкими концентрациями некоторых из субстратов, далеко не все из этих реакций вносят значимый вклад в образование H_2S .

3-МСТ, локализованная как в матриксе митохондрий, так и в цитоплазме, катализирует образование H_2S из 3-меркаптопирувата. Наибольшая H_2S -продуцирующая активность для 3-МСТ показана в мозге, почках и некоторых иммунных клетках [41]. 3-Меркаптопируват образуется при трансаминировании цистеина цистеинаминотрансферазой (ЦАТ, ЕС 2.6.1.3) либо при прямом окислительном дезаминировании D-цистеина оксидазой D-аминокислот (ДАО, ЕС 1.4.3.3), в ходе которого также образуется H_2S . Реакция, катализируемая 3-МСТ, происходит с переносом атома серы с 3-меркаптопирувата на остаток цистеина фермента. В ходе реакции образуется стабильный персульфид 3-МСТ и пируват, фермент регенерирует при атаке нуклеофила на персульфид. Наиболее эффективно с

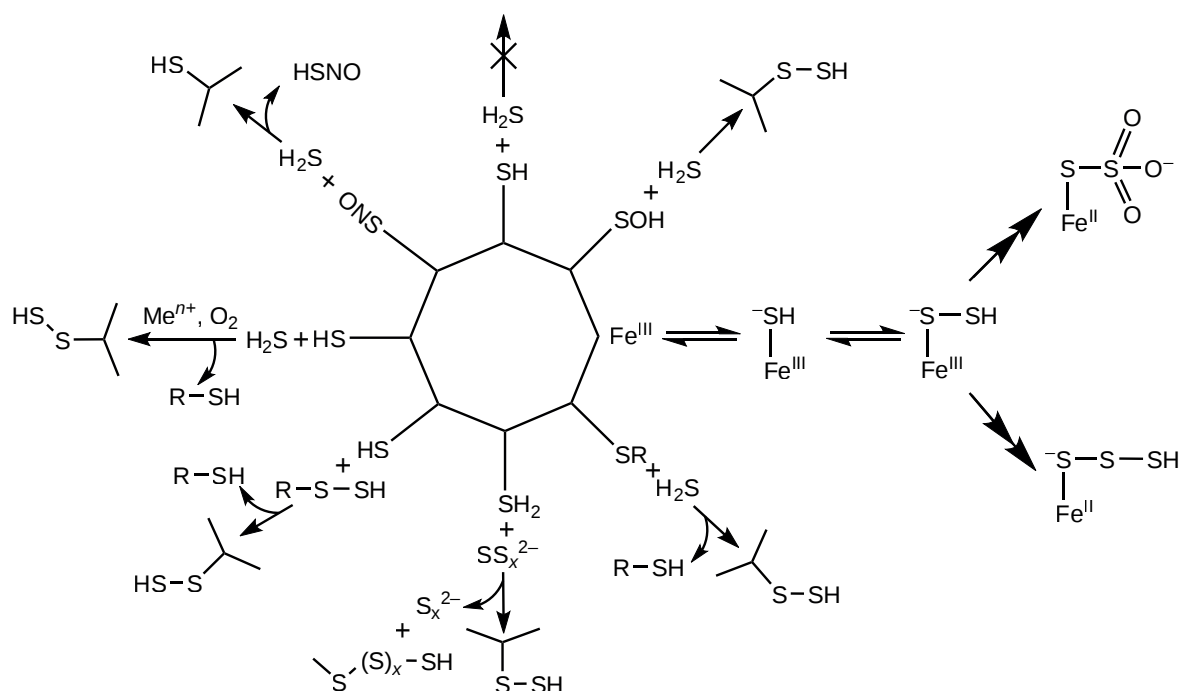


Рис. 3. Основные АФС-опосредованные модификации белковых молекул, пояснения в тексте.

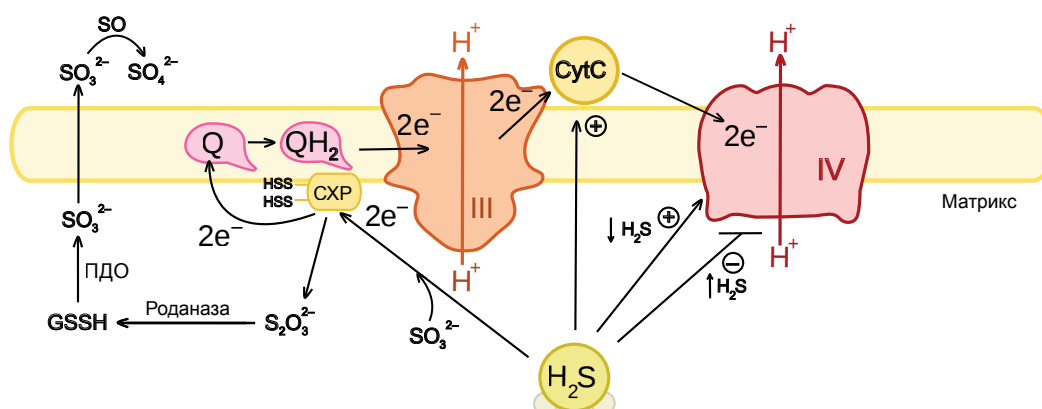


Рис. 4. Митохондриальный метаболизм H_2S и взаимодействие с компонентами дыхательной цепи. CytC – цитохром с, Q – убинон, QH_2 – убинол, ПДО – персульфиддиоксигеназа, CXP – сульфохинонредуктаза, СО – сульфитоксидаза, III – третий комплекс дыхательной цепи убинол-цитохром с-редуктазы, IV – четвертый комплекс дыхательной цепи цитохром с-оксидазы.

клеточные ферментативные системы катаболизма H_2S , из них основной – митохондриальный путь окисления H_2S (рис. 4). Первую реакцию, в которой происходит двухэлектронное окисление H_2S до тиосульфата или персульфида глутатиона (GSSH) в зависимости от акцептора (сульфит или глутатион (GSH)) и восстановления убинона до убинола, катализирует фермент внутренней митохондриальной мембраны – сульфохинон-

редуктаза (CXP, EC 1.8.5.4) [50]. Электроны при этом поступают в ЭТЦ, таким образом, сульфид – первый открытый неорганический донор электронов в дыхательной цепи млекопитающих [50]. Далее, если продуктом реакции является тиосульфат, он вступает в роданазную реакцию и образует GSSH. Затем так или иначе образованный GSSH окисляется персульфиддиоксигеназой (ПДО, EC 1.13.11.18) до сульфит-иона и

GSH; сульфит-ион затем окисляется до сульфата сульфитоксидазой (CO, EC 1.8.3.1) [51].

Считается, что главный механизм, обуславливающий участие H_2S в клеточном сигналинге, основан на окислительной посттрансляционной модификации остатков цистеинов – персульфидации (рис. 3) [33], которая имеет место в физиологических условиях и повышается в условиях окислительного стресса. Подобно другим окислительным модификациям тиоловых групп белков, персульфидация может как активировать, так и инактивировать отдельные белки, таким образом, потенциально адаптируя их функции к изменяющимся условиям. Кроме того, персульфидация может предотвращать необратимое окисление тиолов. Однако до сих пор точный механизм этого процесса не установлен [52]. Предполагают, что существует два основных механизма неферментативной персульфидации белков. Во-первых, некоторые тиоловые группы белков могут вступать в две последовательные реакции: сначала с пероксидом водорода (H_2O_2), а затем с H_2S , что приводит к образованию персульфидов. Во-вторых, ряд белков может взаимодействовать непосредственно с H_2S по дисульфидной связи с образованием персульфидов [53]. Однако обе реакции протекают медленно и не могут объяснить тот факт, что множество белков обнаружено в персульфидированном состоянии даже в отсутствие окислительного стресса. Также известно, что низкомолекулярные персульфиды, например, персульфиды глутатиона и цистеина (GSSH и Cys-SSH), образующиеся в клетках, способны переносить единичные атомы серы на тиолы [54], однако их участие в трансперсульфидации пока не было подтверждено. Также существует предположение, что посттрансляционная персульфидация белков осуществляется ферментативно с помощью одной или нескольких серных трансфераз. Недавно были получены экспериментальные подтверждения этих предположений [52]. Было показано, что 3-МСТ – фермент, который ассоциируется в основном с генерацией H_2S и, как ранее считалось, способен переносить атомы серы на тиоловые группы только двух белков – тиоредоксина и MOCS3/Uba4 для последующего тиолирования

тРНК и умирлирования белков [55], – обладает персульфидирующей активностью по отношению к гораздо более широкому кругу белков. Так, например, в условиях *in vitro*, а также в экспериментах на культуре дрожжей было установлено, что даже флуоресцентный белок гоGFP и бычий сывороточный альбумин являются акцепторами атомов серы от 3-МСТ. Также в экспериментах *in vitro* было показано, что данный фермент – не основной производитель неорганических полисульфидов, что еще раз подтверждает идею о том, что прямое транссульфирование – преобладающий способ 3-МСТ-опосредованной персульфидации белков. Кроме того, на культуре клеток человека было продемонстрировано, что истощение пула 3-МСТ приводит к общему снижению уровня персульфидации белков [52]. Вышеописанные данные в совокупности с существовавшими ранее наблюдениями, что сверхэкспрессия 3-МСТ увеличивает содержание внутриклеточной “связанной” сульфановой серы (S0), потенциально указывающее на прямую роль этого фермента в общей персульфидации белков [56], позволяют заключить, что 3-МСТ действительно обладает способностью персульфидировать различные белки в физиологических условиях.

Персульфиды наряду с полисульфидами – наиболее широко исследуемые АФС, вместе эти соединения называют соединениями сульфановой серы или просто сульфановыми соединениями. Путей их образования несколько, некоторые пути биосинтеза были уже рассмотрены выше, однако оставшиеся занимают не менее важное место в биохимии АФС. Так, H_2S может реагировать напрямую с дисульфидами, особенно в компартментах, в которых их концентрация повышена вследствие окислительных условий, например, в люмене эндоплазматического ретикула [57]. Другой путь образования персульфидов – реакция H_2S с остатками сульфеновых кислот ($-SOH$) в белках или низкомолекулярных соединений, образующихся в клетке в ходе окисления гипогалогенными кислотами и/или пероксидами [24]. Третий путь – реакция H_2S с остатками нитрозотиолов (RSNO) в белках и низкомолекулярных соединениях [58].

Показана важная роль котрансляционного встраивания персульфидов цистеина, генерирующихся при катализе цистеил-тРНК-синтазами (ЕС 6.1.1.16) реакций образования соответствующих цистеил-тРНК. Таким образом, персульфид цистеина можно считать протеиногенной аминокислотой, поскольку он встраивается в полипептидную цепь уже на этапе трансляции вместо соответствующих цистеинов [59]. Это может играть следующую физиологическую роль: образование сульфонов цистеина в клеточных условиях необратимо и наблюдается при выраженном или локальном окислительном стрессе, у персульфидированных же остатков окисляется дистальный атом серы, который может быть отсоединен антиоксидантными системами клетки с восстановлением интактного остатка цистеина. Таким образом, в персульфидированном состоянии белки лучше защищены от окислительного стресса [60].

Пер- и полисульфиды – более реакционноспособные молекулы, чем H_2S . В схожих реакциях они проявляют более сильные нуклеофильные свойства и рассматриваются в качестве непосредственных участников сигналинга H_2S . Это связано с их более низкими значениями pK_a относительно тиолов и H_2S , что приводит к высокой доступности анионной формы, но, в то же время, с наличием α -эффекта [24, 61–63]. Интересны и электрофильные свойства сульфановых соединений, практически не выраженные у H_2S и тиолов. Так, полисульфиды могут выступать в качестве электрофилов в реакциях с низкомолекулярными тиолами и остатками цистеина белков с образованием полиотиолированных остатков цистеина $(R-(S)_n-SH)$ с разным количеством атомов серы. В дальнейшем при наличии пространственно близких остатков цистеина или других тиолов могут образовываться ди-, три-, тетра- и пентасульфидные связи [64]. H_2S не способен напрямую производить подобные модификации, хотя в экспериментах с его экзогенной добавкой наблюдались похожие эффекты, что, вероятно, связано с использованием предокисленных доноров H_2S [61].

Для персульфидации как регуляторной модификации показаны также механизмы ее

удаления. В этом участвуют две ферментативные антиоксидантные системы: тиоредоксиновая и глутаредоксин-глутатионредуктазная [65, 66]. Они осуществляют NADPH-зависимую деперсульфидацию остатков CysSSH и персульфидов глутатиона с образованием H_2S и соответствующих тиолов. Однако на сегодняшний день остается малоизученной регуляция этих процессов и их эффективность для различных белковых мишеней.

3. ОСНОВНЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ И МИШЕНИ АФС

Сероводород и его производные, в первую очередь, поли- и персульфиды, – это сигнальные молекулы, которые активно участвуют в регуляции физиологических и биохимических процессов не только в клетках и тканях млекопитающих, но также у бактерий и растений. Первые исследования регуляторной роли H_2S были начаты в конце XX века в рамках его влияния на нейромодуляцию [1]. У млекопитающих эндогенный H_2S контролирует целый ряд физиологических процессов и участвует в регуляции патогенеза различных заболеваний, таких как гипертония, атеросклероз, инфаркт миокарда и др. [16]. Для H_2S и его производных показана антиапоптотическая активность, что важно при изучении действия H_2S как эффекторной молекулы в модели ишемии-реперфузии и воспаления. Например, H_2S -опосредованная персульфидация остатка Cys-38 субъединицы p65 белка NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells) приводит к его транслокации в ядро и к активации экспрессии TNFR (рецептор фактора некроза опухолей)-ассоциированного фактора, каспазы-8-с-FLP и клеточных ингибиторов апоптоза [8, 67]. Экспрессия TNFR также приводит к повышению экспрессии ЦГЛ, что приводит к увеличению продукции H_2S [14]. Также H_2S персульфидирует остаток Cys-151 белка Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), что по неизвестному пока механизму приводит к транслокации белка Nrf2 (NF-E2-related nuclear factor 2) в ядро и к активации экспрессии цитопротекторных белков, таких как глутатион-S-трансфераза, ферритин, эпоксид-

гидролаза [40, 68]. Кроме того, H_2S персульфидирует остаток Cys-341 белка MEK1 и индуцирует последующее фосфорилирование ERK1/2 с дальнейшей активацией PARP1 (poly ADP-ribose polymerase 1), что в целом приводит к активации путей репарации ДНК [69]. Таким образом, АФС оказывают влияние на основные сигнальные пути, функционирующие в различных системах организма.

3.1. Влияние АФС на сердечно-сосудистую систему

К настоящему моменту установлено, что АФС оказывают влияние на сердечно-сосудистую систему, в частности снижают повреждающее действие ишемии-реперфузии на миокард, стимулируют ангиогенез, вызывают расслабление гладкой мускулатуры и участвуют в регуляции артериального давления [10]. Одна из первых обнаруженных биологических активностей H_2S – вазодилатация [7], поэтому влияние H_2S на состояние сосудов представляет собой важный фактор при исследовании механизмов развития таких патологических состояний, как артериальная гипертензия и ишемия-реперфузия. Данное свойство H_2S применяют при создании препаратов для лечения гипертонии, для этого разрабатываются доноры H_2S в качестве антигипертензивных препаратов [4]. Однако механизм H_2S -опосредованной дилатации еще не до конца изучен. Известно, что H_2S стимулирует вазодилатацию посредством активации АТФ-зависимого калиевого канала в результате персульфидации, что приводит к гиперполяризации гладкомышечных клеток в стенках сосудов [70]. Воздействие на Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы, наоборот, вызывает их блокирование, что, вероятно, ввиду различной концентрационной зависимости и степени представленности не приводит к вазоконстрикции [71]. При этом действие H_2S происходит синергично с $\cdot NO$. Поэтому имеет место либо непосредственное взаимодействие H_2S и $\cdot NO$, либо с ферментами синтеза $\cdot NO$. Совместное действие H_2S и $\cdot NO$ связано также с образованием нитрозотиолов в нейронах, регулирующих тонус сосуда [72]. Нитрозотиолы активируют TRPA-каналы и повышают концентрацию кальция внутри нейрона. В резуль-

тате происходит экзоцитоз везикул с кальцитонин-ген-родственным пептидом (ПРГК), который, в свою очередь, активирует рецептор, ассоциированный с G-белком, на гладкомышечной клетке в стенке сосуда [73]. Это событие способствует активации аденилатциклазы, синтезу цАМФ и активации протеинкиназы А. Протеинкиназа А потенциально способна повышать активность эндотелиальной $\cdot NO$ -синтазы [73]. Персульфидация цистеина в положении 443 $\cdot NO$ -синтазы повышает активность фермента, что приводит к увеличенной продукции $\cdot NO$ и, в свою очередь, к активации растворимой гуанилатциклазы. При этом известно, что H_2S усиливает связывание $\cdot NO$ гуанилатциклазой [74]. Синтез цГМФ активируется, а его распад подавляется в результате связывания H_2S с ионами Zn^{2+} в составе фосфодиэстеразы. Описываемые эффекты приводят к вазодилатации (рис. 5) [75].

Различные эндотелиальные сигналы, например, сигналинг фактора роста эндотелия сосудов (VEGF – Vascular endothelial growth factor), осуществляемый с участием НАДФН-оксидаз и образованием H_2O_2 в качестве сигнальной молекулы, приводит к увеличению экспрессии и активности ЦГЛ. В свою очередь, ЦГЛ – наиболее важный и активный фермент синтеза H_2S в сердечно-сосудистой системе [76, 77]. Повышенный уровень H_2S и АФС приводит к увеличению активности эндотелиальной синтазы оксида азота и гуанилатциклазы по описанному выше механизму, что и запускает последующие каскады, которые приводят к пролиферации и дифференцировке эндотелиальных клеток, стимулируя ангиогенез [72]. Также H_2S может дозозависимо увеличивать количество миоэпителиальных клеток, влиять на их миграцию и образование миотуб посредством Akt-сигнального пути. У мышей, нокаутных по ЦГЛ, было подавлено образование микрокапилляров, а H_2S способствовал усилению ангиогенеза через сигнальный путь MAPK (митоген-активированная протеинкиназа). В качестве молекулярного переключателя H_2S специфически разрывает дисульфидную связь Cys-1045–Cys-1024 в рецепторе фактора роста эндотелия сосудов второго типа (VEGFR2) и приводит к изменению его конформации, что

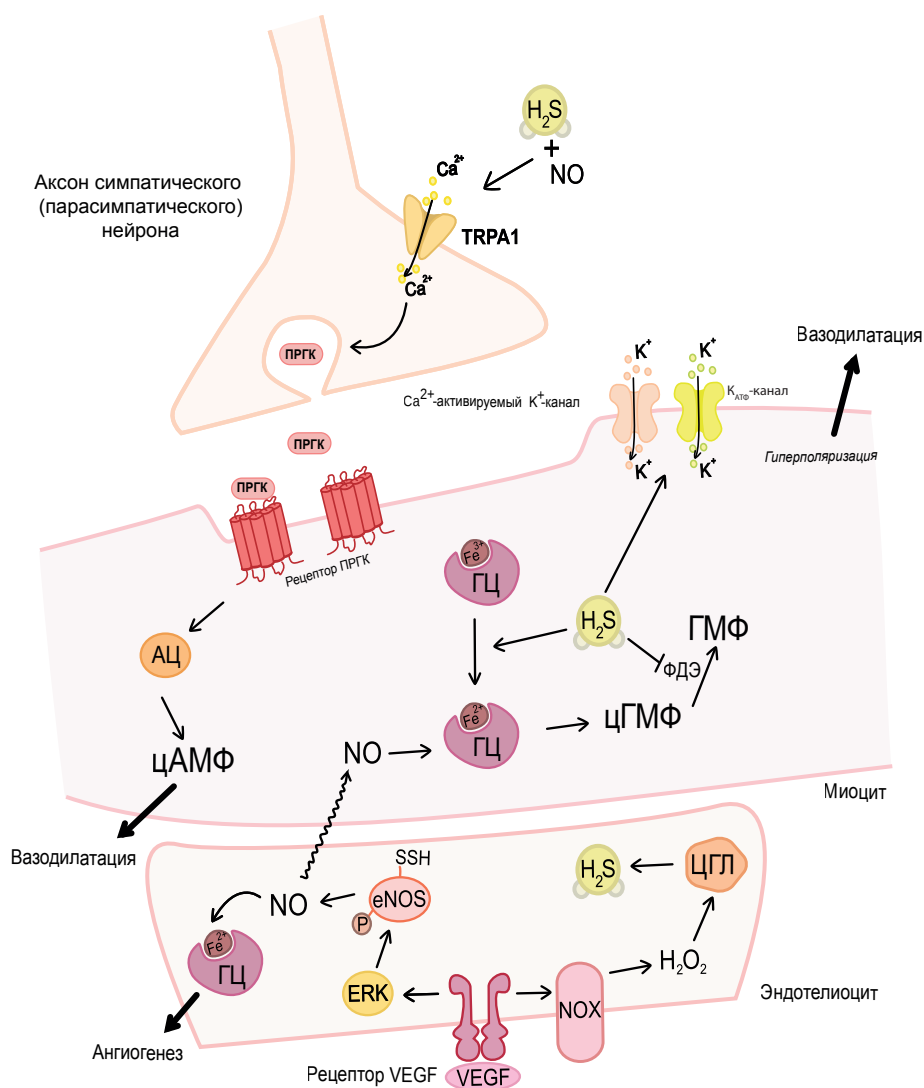


Рис. 5. Регуляция вазодилатации посредством H_2S и $\cdot\text{NO}$. ПРГК – кальцитонин-ген-родственный пептид, K_{ATP} -канал – АТФ-зависимый K^+ -канал, АЦ – аденилатциклаза, ГЦ – гуанилатциклаза, ЦГЛ – цистатинин-γ-лиаза, VEGF – фактор роста сосудистого эндотелия, eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота(II), NOX – НАДФН-оксидаза.

приводит к стимуляции ангиогенеза [78]. Кроме того, H_2S усиливает активность сигнального трансдуктора и активатора транскрипции 3 (STAT3), а также увеличивает фосфорилирование мишени рапамицина (mTOR) через путь VEGFR2 и стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток [79].

H_2S обладает кардиопротекторным действием. Показано, что как эндогенный, так и экзогенный H_2S способствует предотвращению

развития атеросклероза, аритмий, гипертрофии и инфаркта миокарда и др. При этом кардиопротекторный эффект достигается путем повышения уровня фосфорилирования серин-трионинновой протеинкиназой $\text{RAC}\alpha$, а также посредством транслокации в ядро респираторного фактора 1 и фактора 2, связанного с эритроидом-2, что активировало антиапоптотический сигналинг, ингибировало апоптоз и повышало биогенез митохондрий [80]. Таким образом, АФС (в частности

H₂S) – это важные регуляторы метаболизма сердечно-сосудистой системы.

3.2. Влияние АФС на нервную систему

Как было описано выше, в нервной системе экспрессируется ЦБС – один из основных ферментов, обеспечивающих эндогенный синтез H₂S. Методами иммуногистохимического исследования было показано, что данный фермент локализован в астроцитах и микроглии, а также в некоторых нейронах, например, в клетках Пуркинье и нейронах гиппокампа [81]. ЦБС-опосредованная продукция H₂S связана с активацией Ca²⁺/кальмодулинового сигнального пути после возбуждения нейронов. АФС и, в частности, H₂S оказывают воздействие на нервную систему посредством модуляции нейротрансмиссии [40]. Так, например, известно, что глутамат – один из основных нейромедиаторов, вовлеченных в процессы обучения, формирования памяти, долговременной потенциации, действующий на рецепторы *N*-метил-D-аспартата (NMDA). При этом H₂S способствует увеличению токов, связанных с данным рецептором, путем активации аденилатциклазы и нижележащих каскадов циклического аденозинмонофосфата (цАМФ)/протеинкиназы А. Была показана персульфидация NR2A-субъединицы NMDA-рецептора, которая, по всей видимости, и ответственна за описанные выше эффекты [82]. Кроме того, АФС способны оказывать влияние непосредственно на секрецию глутамата, усиливая ее, что приводит к гибели нейронов в результате глутамат-опосредованной эксайтотоксичности [83]. Другой пример влияния H₂S на рецепторы нейромедиаторов – воздействие на рецептор гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК). ГАМК – основной тормозный медиатор, а дефицит ГАМКэргического торможения приводит к фебрильным судорогам и повышенной возбудимости нейронов. H₂S уменьшает повреждение гиппокампа, вызванное повторяющимися припадками, за счет усиления ГАМКэргического торможения. Причем данный эффект реализуется не благодаря увеличению количества нейромедиатора, а в результате повышения количества рецепторов, что показано как на уровне мРНК, так и на уровне белка [84].

Вероятно, это происходит в результате повышения внутриклеточной концентрации кальция как за счет активации каналов типа TRPA, Ca²⁺-каналов Т- и L-типов, так и стимуляции кальций-зависимой транскрипции [85, 86]. Также в экспериментах на культурах микроглии и астроцитов было показано, что мишенью H₂S выступают Cl[–]/HCO₃[–] и Na⁺/H⁺-обменники, воздействие на которые приводит к развитию ацидоза [87]. Также важная функция H₂S в нервной системе – ингибирование окислительного стресса. Так, например, H₂S предотвращает NOCl-опосредованную инактивацию α1-антитрипсина, окисление белков, цитотоксичность и перекисное окисление липидов [88]. H₂S также защищает эндотелиальные клетки мозга от метионин-индуцированного окислительного стресса [89].

Во время развития различных нейродегенеративных заболеваний наблюдается изменение уровня эндогенной продукции АФС. У пациентов, страдающих от болезни Альцгеймера, регистрировали пониженный уровень H₂S [90]. При этом в экспериментах на культурах нейрон-подобных клеток было показано, что при участии сигнального пути PI3K/Akt H₂S способствует снижению уровня экспрессии белка BACE-1, который отвечает за синтез β-амилоида [91]. При моделировании болезни Альцгеймера на первичной культуре и линии BV-2 было показано, что H₂S может защищать микроглию от β-амилоид-индуцированного (Аβ-индуцированного) повреждения, подавляя продукцию таких медиаторов воспаления, как NO и TNF-α в культуре клеток, обработанных Аβ [92]. Также предположительно H₂S подавляет продукцию Аβ в самих нейронах за счет ингибирования гликозилирования белка-предшественника и активности γ-секретазы, отрезающей Аβ от самого белка-предшественника [93] (рис. 6).

Также сниженный уровень H₂S характерен для болезни Гентингтона. Это связано с тем, что мутантный гентингтин ингибирует SP1 – транскрипционный активатор ЦГЛ. Уровень экспрессии данного фермента снижается, что закономерно приводит к сокращению продукции H₂S [94].

Подробно исследована цитопротекторная роль H₂S при болезни Паркинсона (БП). Эта болезнь

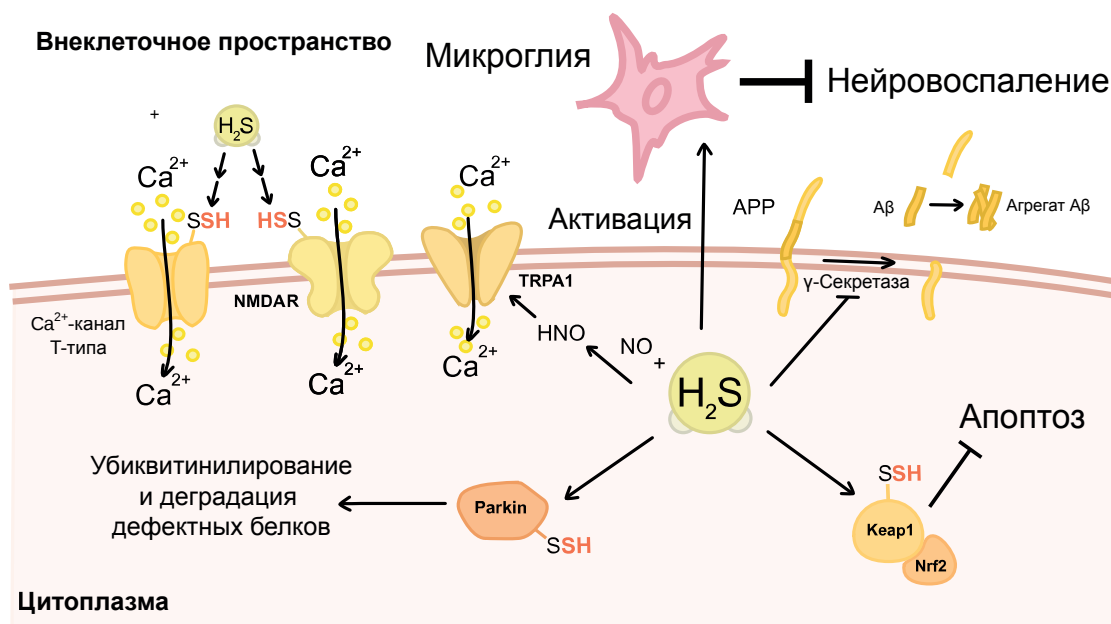


Рис. 6. АФС-опосредованная регуляция в нейронах, пояснения в тексте. NMDAR – ионотропный рецептор NMDA, APP – белок-предшественник амилоида, TRPA1 – член 1 подсемейства А переходных рецепторных потенциалных ионных каналов (Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1), Nrf2 – ядерный фактор 2, связанный с E2 (nuclear E2 related factor 2), Keap1 – келч-подобный ECH-ассоциированный белок 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1).

ассоциируется со значительным снижением персульфидации убиквитинлигазы Parkin, которая при патологии модифицирована в значительно меньшей степени, нежели в норме. В норме персульфидация Parkin по определенным остаткам увеличивает ее убиквитинлигазную активность, таким образом, количество дефектных белков в цитоплазме снижается [95]. В модификации ферментов также важен баланс персульфидации и нитрозилирования. Так, персульфидация активирует Parkin, а нитрозилирование, напротив, снижает ее активность [95]. Известно, что полисульфидирование оказывает нейропротекторное действие, влияя на такие белки, как Keap1, каналы TRPA1, гораздо сильнее, чем H_2S [96]. Описанные выше данные свидетельствуют об исключительно важной регуляции баланса АФС для нормального функционирования нервной системы.

3.3. Влияние АФС на эндокринную систему

Среди всех органов эндокринной системы поджелудочная железа и влияние на нее АФС

наиболее изучены. Высвобождение инсулина из островков Лангерганса – критическое событие при регуляции метаболизма глюкозы и патогенезе инсулинорезистентности. Экзогенный H_2S в физиологически значимых концентрациях значительно подавляет индуцированное глюкозой высвобождение инсулина. Такое же влияние эндогенного H_2S на высвобождение инсулина было показано в экспериментах со сверхэкспрессией ЦГЛ. В то же время нокдаун гена фермента приводил к противоположному результату [97]. Ингибиторный эффект H_2S в значительной степени связан со стимуляцией АТФ-чувствительных калиевых каналов в β -клетках [97]. На культуре клеток INS-1E было показано, что сверхэкспрессия ЦГЛ вызывает апоптоз и снижает жизнеспособность клеток, равно как и воздействие экзогенного H_2S , из-за ингибирования киназы 1/2 (ERK1/2) с одновременной активацией p38 MAPK. Проапоптотический эффект H_2S обусловлен активацией эндоплазматического ретикула [98].

Таким образом, АФС могут оказывать двойственное воздействие на различные системы органов в зависимости от концентрации, демонстрируя как протекторные, так и повреждающие свойства.

3.4. Участие АФС в реакциях воспаления

Воспаление – физиологическая защитная реакция организма, возникающая в ответ на повреждение тканей или появление патогенного раздражителя, направленная на удаление продуктов и агентов повреждения. Воспалительные реакции могут быть острыми и хроническими. Хроническое воспаление – спутник большого количества заболеваний, поэтому оно считается самой распространенной причиной смертности [99]. Известно, что в регуляции воспалительных реакций задействованы АФК и АФА [100]. В последние годы все активнее идет исследование участия АФС в патогенезе воспалительных заболеваний. Так, было показано благотворное влияние H_2S при различных сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и костно-мышечных заболеваниях с воспалительным компонентом, таких как остеоартрит. Считается, что этот эффект связан с реакциями персульфидации. Однако все больше экспериментальных данных свидетельствует о том, что не сероводород, а полисульфиды отвечают за эту посттрансляционную модификацию белков [101]. Было показано, что полисульфиды и персульфиды обладают антиоксидантным и противовоспалительным действием. Они гораздо эффективнее нейтрализуют пероксид водорода, чем H_2S . Эти соединения также ингибируют синтез таких факторов, как $TNF-\alpha$ и $IFN-\beta$, которые продуцируются макрофагами в ответ на вызванную липополисахаридами активацию Toll-подобного рецептора 4-го типа (TLR4) [102]. В экспериментах с индукцией развития гепатита при помощи конканавалина-А также была показана противовоспалительная активность полисульфидов. Пероральное введение дипропилполисульфидов экспериментальным животным приводило к снижению экспрессии таких маркеров воспаления, как $IL-1\beta$, $IL-12$ и $IL-16$, при одновременном повышении экспрессии противовоспалительного маркера – $IL-10$ [103].

Однако существует большое количество данных о том, что H_2S обладает и провоспалительной активностью. Так, например, при исследовании панкреатита было показано, что уровень H_2S , вырабатываемого ЦБС и ЦГЛ, повышен на фоне признаков воспаления и развития острой фазы заболевания. Применение ингибиторов ферментов синтеза H_2S способствовало облегчению течения болезни [104]. При этом доноры, обеспечивающие медленное высвобождение сероводорода, также демонстрировали противовоспалительное воздействие [105]. В печени наблюдается наибольший конститутивный уровень экспрессии ЦГЛ, что приводит к достаточному высокому базовому уровню H_2S . Это закономерно, учитывая, что печень – ключевой орган для производства и выведения H_2S [106]. Эндогенно вырабатываемый H_2S участвует в регуляции метаболизма глюкозы, липидов и ксенобиотиков в печени [107]. Изменение уровня эндогенной продукции H_2S приводит к ряду заболеваний печени, включая фиброз, цирроз, а также некоторые виды онкологических заболеваний [108]. Низкий уровень H_2S обеспечивает цитопротекторный эффект, в то время как высокая концентрация H_2S может оказывать гепатотоксическое действие [109]. Кроме того, H_2S принимает участие в некоторых аспектах функционирования почек, например, в регуляции водно-солевого баланса – скорости клубочковой фильтрации и реабсорбции натрия и калия [110]. Ферменты, ответственные за биосинтез H_2S (ЦБС, ЦГЛ и 3-МСТ), обнаруживаются практически во всех частях почки, при этом в проксимальных канальцах уровень их экспрессии относительно высок [111, 112]. При развитии сепсиса наблюдают повышенный уровень H_2S в плазме крови и повышенный уровень экспрессии ЦГЛ, в то время как введение ингибиторов фермента способствует снижению уровня инфильтрации почек лейкоцитами [113].

Таким образом, роль АФС в реакциях воспаления неоднозначна и требует дополнительного исследования. Широко применяемый метод терапии и подавления воспалительных реакций – использование стероидных гормонов и иммуносупрессоров, однако эти средства обладают ши-

роким спектром побочных эффектов. Данные, полученные за последние несколько лет, свидетельствуют в пользу того, что потенциальными терапевтическими агентами могут служить доноры АФС, однако при их использовании следует учитывать скорость высвобождения АФС.

4. ДЕТЕКЦИЯ АФС

Существуют два основных подхода к детекции АФС: прямой, когда определяется концентрация эффекторной молекулы, и косвенный, при котором анализируются АФС-опосредованные модификации белков. В данном разделе мы остановимся на основных методах определения уровней H_2S , пер- и полисульфидов.

4.1. Прямая детекция АФС

Методы этой группы позволяют количественно или полуколичественно определять концентрацию целевых соединений в биологических образцах. В целом их можно разделить на две большие группы. К первой относятся методы, которые можно применять для мониторинга внутри- или внеклеточных концентраций АФС *in vivo*, ко второй – методы *in vitro*, подразумевающие получение препаратов с нарушением целостности исследуемых объектов.

4.2. Методы прижизненной детекции АФС

Для прижизненного исследования подходят различные инструменты визуализации, такие как флуоресцентные красители, генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры и методы, основанные на принципе гигантского комбинационного рассеяния [114, 115].

Среди флуоресцентных красителей выделяют несколько групп. Механизм их функционирования основан на различных реакционных свойствах АФС (рис. 7): нуклеофильных, окислительно-восстановительных и способности преципитировать ионы металлов.

Одна из наиболее широко представленных групп красителей использует окислительно-восстановительные свойства H_2S [116]. Разработано большое количество проб, способных восстанавли-

ваться при реакции с H_2S , самые широко представленные из них содержат азидную ($-N_3$, рис. 7а) или нитрогруппу ($-NO_2$, рис. 7б) и превращаются в соответствующие аминопроизводные, меняя при этом флуоресцентные свойства [117–119]. Данные красители, однако, реагируют необратимо и отличаются довольно низкими характерными скоростями реакций с H_2S , кроме того, остается неясной степень интерференции других внутриклеточных восстановителей, например, тиолов. H_2S может вступать в двойные нуклеофильные реакции (реакция (4)), в то время как монозамещенные тиолы (глутатион, цистеин), более широко представленные в клетке, могут вступать только в одну нуклеофильную реакцию (реакция (3)). На основе этого созданы флуоресцентные зонды с двумя электрофильными центрами, способные отличать H_2S от похожих соединений. H_2S способен реагировать с более электрофильной частью красителя с образованием промежуточного продукта, содержащего свободную SH-группу, которая, в свою очередь, может подвергаться присоединению по Михаэлю или спонтанной циклизации с изменением параметров флуоресценции зонда [120] (рис. 7в). Существуют также красители, работающие на основе механизмов присоединения H_2S по двойным углерод-углеродным связям [121, 122], а также на реакциях тиолиза [123]. Третья из основных групп красителей основана на крайне низких произведениях растворимости сульфидов меди(II) и цинка ($IP_{CuS} = 6.4 \times 10^{-36}$; $IP_{ZnS} = 1.6 \times 10^{-24}$) [124]. Ион металла в хелатированной форме выступает в качестве тушителя флуоресценции, при реакции с H_2S происходит образование соответствующего сульфида, сопровождающееся значительным усилением флуоресценции (рис. 7г) [125]. Для проб этого типа также неясны паттерны селективности, поскольку хелатировать или восстанавливать, например, ионы Cu^{2+} , могут тиолы и NO. Кроме того, наиболее эффективно хелатирование происходит с формой S^{2-} , которая наименее представлена при физиологических значениях pH (pH 7.0–7.5) [126].

Зонды для детекции сульфановых соединений основаны на реакциях либо нуклеофильных (рис. 7д), либо электрофильных (рис. 7е) групп

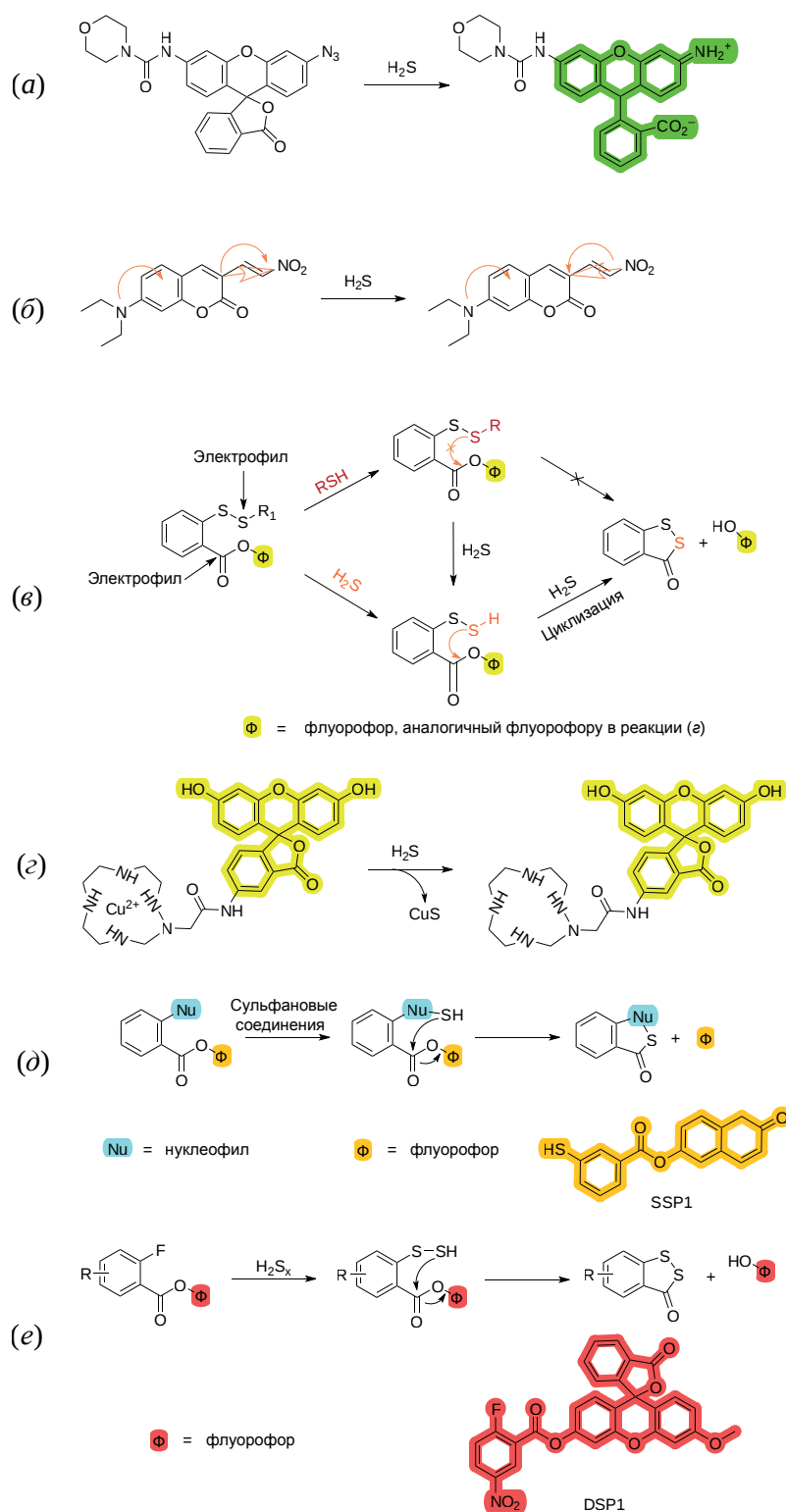


Рис. 7. Флуоресцентные красители для детекции H_2S (a–г) и сульфановых соединений (д, е). (a, б) – Представители красителей, восстанавливающих H_2S до аминогруппы из азидной группы (a) или нитрогруппы (б); (в) – красители с двумя электрофильными группами, показана дискриминация H_2S от других тиоловых агентов; (г) – преципитационный краситель, основанный на образовании CuS из Cu^{2+} , приводящем к усилению флуоресценции; (д, е) – красители, реагирующие с сульфановыми соединениями на основе нуклеофильных (д) или электрофильных (е) групп с последующим усилением флуоресценции.

красителя с аналитом с образованием ковалентных аддуктов и последующим усилением флуоресценции за счет высвобождения флуорофорной части или, наоборот, за счет ослабления тушения [127–129].

Синтетические красители обладают рядом недостатков, осложняющих их применение в биологических системах, среди них – цитотоксичность, низкая степень прохождения через клеточные мембраны, зачастую необратимость (одноразовость) ответа. Также с точки зрения практического применения коммерчески доступны менее десятка из описанных красителей. Однако главный недостаток таких красителей – ограничения, связанные с применением *in vivo* или направленной локализации в определенных внутриклеточных компартментах.

В качестве решения данной проблемы хорошо подходят генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры на основе GFP-подобных белков, которые могут быть легко направлены в различные клеточные компартменты (например, в ядро, матрикс и межмембранное пространство митохондрий, ЭПР). Такие инструменты во многих случаях представляют безальтернативный подход к изучению соединений с высокой реакционной способностью в условиях *in vivo*. Для детекции H_2S был создан такой белковый биосенсор *cpGFP-Tyrb6pAzF* на основе GFP, однако он содержит хромофор, который синтезируется из неприродной аминокислоты – *n*-азидофенилтирозина (*pAzF*) [130]. Данная аминокислота встраивается на место остатка тирозина в последовательность биосенсора и участвует в созревании хромофора, формируя структуру, которая не демонстрирует флуоресцентных свойств по аналогии с азидными красителями, рассмотренными выше. Однако при реакции с H_2S азидная группа восстанавливается до аминогруппы, что приводит к значительному усилению флуоресценции. Из недостатков следует отметить необратимость данной модификации, поэтому биосенсор *cpGFP-Tyrb6pAzF* имеет “одноразовый” характер действия. Данный тип сенсоров не получил широкого применения на практике в основном из-за сложности применения не только в моделях *in vivo*, но и на клеточных культурах, поскольку для сборки такого

биосенсора в клеточной системе необходимо внедрять не только его ген, но и соответствующую аминокислоту, ген аминокислот-тРНК-синтетазы и аминокислот-тРНК.

Другие генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры для регистрации сульфано-вых соединений *psGFP* и *psRFP* (модифицированный *mCherry*) основаны на внедрении двух остатков цистеина вблизи хромофора. Эти редокс-активные остатки цистеина расположены на расстоянии, не позволяющем сформировать между ними дисульфидную связь, но доступном для образования трисульфидной связи при взаимодействии с пер- и полисульфидами. Формирование связи между указанными остатками флуоресцентного белка приводит к изменению его спектральных характеристик [131, 132]. Биосенсоры такого типа неселективны, поскольку способны вступать в реакцию со множеством биологически значимых окислителей [133, 134].

4.3. Биохимические методы детекции АФС

Существует большое разнообразие биохимических подходов, связанных с анализом *ex vivo* образцов или гомогенатов, которые позволяют провести достаточно точную количественную оценку исследуемых модификаций, однако при этом теряется информация о пространственной и временной динамике АФС. Возможны также артефакты измерений, связанные с высвобождением лабильной серы, например, из железосерных кластеров, а также с потерями из выделяемых образцов газообразного H_2S при физиологических значениях pH [135]. Анализу применений и особенностей данных методов посвящено большое количество работ [6, 125, 136–138]. Среди них наиболее распространены подходы для детекции H_2S с использованием колориметрических методов с образованием производных, например, на основе метиленового синего [139]. Также широко распространено применение высокоэффективной хроматографии с прямой хемилюминесцентной детекцией [140], с детекцией флуоресценции производных монобромбимана и H_2S [141], а также сочетание с масс-спектрометрическими подходами [64].

Интересным подходом для оптимизации скорости измерений и возможности миниатюризации приборов с целью их последующей имплантации в живые организмы могут быть электрохимические сенсоры на основе ион-селективных [142] или полярографических электродов [143]. Однако представленные на сегодняшний день такие подходы характеризуются отличающейся на порядки чувствительностью, поэтому “золотой стандарт” измерения H_2S в биологических образцах по-прежнему отсутствует. Измерение однотипных образцов указанными методами приводит к противоречивым оценкам уровня H_2S [144, 145].

Для измерения уровней сульфановых соединений используются методы холодного цианолиза [24, 146], ВЭЖХ производных алкилирующих агентов монобромбимана [64] или иодацетамида [147], совмещенной с масс-спектрометрией, а также изотопное разбавление, совмещенное с масс-спектрометрией [148]. Для большинства данных методов характерна проблема селективности в отношении какой-либо группы сульфановых соединений, что особенно осложняется при работе со сложными биологическими образцами (гомогенатами, биологическими жидкостями), к тому же персульфиды демонстрируют низкую стабильность при пробоподготовке. Вследствие этого наблюдаются довольно сильные расхождения в оценках уровней сульфановых соединений для схожих образцов с применением данных методов [24, 146].

4.4. Детекция АФС-опосредованных модификаций белков

Широко распространены методы анализа конечных продуктов реакций АФС – модифицированных белковых молекул, которые изменяют свои свойства или активность в клетке. Среди рассматриваемых модификаций в первую очередь представляют интерес персульфиды и полисульфиды остатков цистеина. Несмотря на то, что данные подходы зачастую позволяют определять белковые регуляторные мишени и даже конкретные модифицированные остатки, все же оказывается невозможным напрямую связать изменение уровней АФС с изменением паттернов модификаций. Данные методы не

всегда количественные, а также они не позволяют следить за процессами с высоким временным разрешением, хотя бы в минутной или даже часовой динамике. Напрямую оценивать наличие подобных модификаций трудно, во-первых, из-за нестабильности персульфидной группы, в том числе при масс-спектрометрии, а во-вторых, из-за крайней схожести в $\Delta m/z$ при персульфидировании и окислении до остатков сульфоновой кислоты [149]. Популярный подход – применение ковалентных меток, специфически реагирующих с АФС-модифицированными остатками цистеина. Важно, чтобы при этом они не вступали во взаимодействия с альтернативными модификациями остатков. Одним из первых подобных подходов стал метод на основе *S*-метилметантиосульфоната (ММТС) и *N*-[6-(биотин-амидо)гексил]-3'-(2'-пиридилтио)пропионамида (биотин-ГПДП), которые последовательно добавляют к образцу, в результате чего происходит специфическое биотинилирование персульфидированных белков с последующим их выделением на стрептавидиновом носителе (рис. 8а). Далее фракцию полученных персульфидированных белков можно анализировать с помощью иммуноблоттинга или масс-спектрометрически [150]. Однако было показано, что при данном методе происходит биотинилирование, в том числе немодифицированных остатков цистеина, а также образование внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей [6, 151].

Простой в использовании метод – обработка образца флуоресцентным производным *N*-этилмалеимида (NEM-Cy5), алкилирующим как остатки цистеина, так и его персульфидированные модификации [14]. После обработки восстанавливающим агентом (ДТТ) флуоресценция персульфидированных белков снижается из-за диссоциации флуоресцентной метки, что можно детектировать в параллельных электрофоретических разделениях (рис. 8б). Стоит заметить, что для NEM показана способность реагировать с аминокетонами [152], что снижает селективность данного метода. Для оптимизации такого подхода с целью получения более высокого разрешения применяют биотин-конъюгированные производные NEM, которые позволяют после трипсинолиза

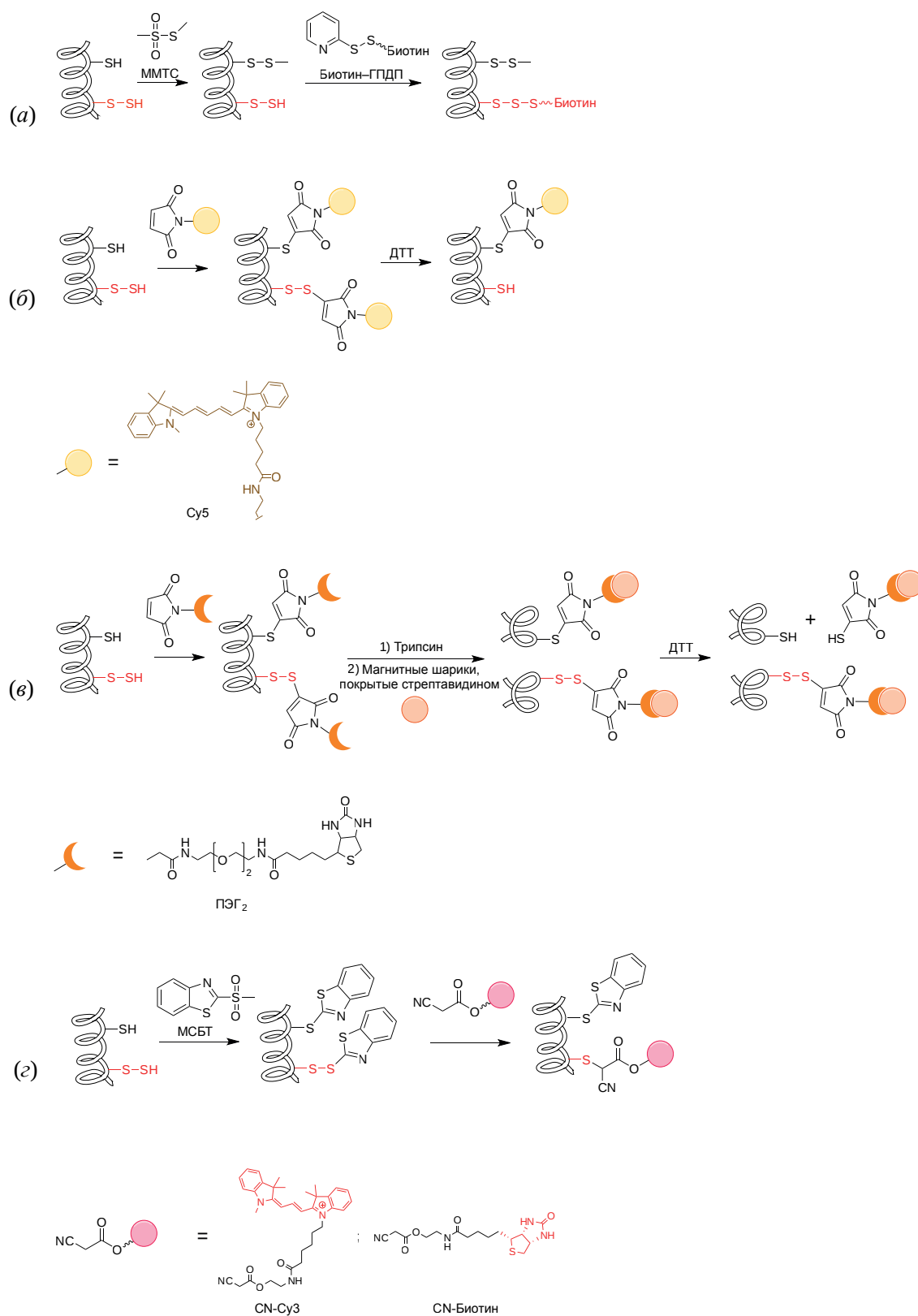


Рис. 8. Подходы для детекции АФС-опосредованных модификаций белков и пептидов. ММТС – S-метилметантиосульфат, биотин-ГПДП – N-[6-(биотинамидо)гексил]-3'-(2'-пиридилтио)пропионамид, ДТТ – дитиотреитол, ПЭГ₂ – полиэтиленгликоль, МСБТ – метилсульфонилбензотиазол. Пояснения см. в тексте.

провести очистку полученных пептидов, содержащих персульфидированные остатки цистеина, с последующим анализом методами ВЭЖХ-МС (рис. 8в) [24, 153]. Модификации данной методики в совокупности с использованием изотопных меток позволяют проводить количественные протеомные исследования, однако анализ может быть затруднен из-за перекрестной реактивности производных NEM с остатками сульфеновых кислот цистеина [154]. Проблема, связанная с занижением оценок уровней модифицированных остатков для рассмотренного выше метода, может быть решена в подходах, в которых сорбция осуществляется только для персульфидированных остатков. В одной из методик было предложено применение метилсульфонилбензотиазола (МСБТ) в качестве блокирующего агента, модифицирующего как тиоловые, так и персульфидные группы. Однако аддукт персульфида и МСБТ с повышенной электрофильностью на следующей стадии методики становится мишенью либо флуоресцентных (CN-Cy3), либо биотинилированных производных (CN-биотин) цианоуксусной кислоты (рис. 8г), для последних в дальнейшем производится аффинная очистка с дальнейшим масс-спектрометрическим анализом [57]. Недостатки данного подхода – низкая растворимость производных МСБТ в водных растворах и низкая стабильность цианоацетатных аддуктов при МС-анализе [24, 153]. Авторами данной методики был предложен ряд изменений, облегчающих процедуру эксперимента за счет использования коммерчески более доступных и более селективных в отношении персульфидов реагентов [77].

Данные протеомных исследований, полученные, по большей части, описанными выше методами, разнятся в оценках представленности персульфидных модификаций остатков цистеиновых белков от ~5% (для протеома MIN6 панкреатической линии клеток мыши) до 0.15% (для протеома линии НЕК293). Такая разница может действительно отражать физиологические различия разных типов клеток, но может быть получена и из-за применения разных подходов [66, 153]. Поэтому разработка надежных методов исследования динамики АФС и определение

модификаций их мишеней по-прежнему остается актуальной задачей.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активные формы серы – важные участники различных сигнальных каскадов, регулирующих как физиологические, так и патофизиологические процессы в живых системах. Существуют убедительные доказательства того, что нарушения синтеза или катаболизма АФС коррелируют с развитием таких социально значимых заболеваний, как болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона, диабет, заболевания сердечно-сосудистой системы и др. [155]. В последнее время как доноры H_2S , так и сами АФС находят все более активное применение в качестве терапевтических агентов [156, 157]. Однако несмотря на достигнутый в последние десятилетия прогресс в установлении механизмов образования, катаболизма и воздействия АФС, многое еще остается малоизученным, не в последнюю очередь, в связи с отсутствием инструментов, позволяющих с высокой селективностью и высоким временным разрешением проводить исследования в условиях *in vivo*. В связи с этим развитие методов детекции АФС остается одной из актуальных задач как современной химии, так и биотехнологических исследований. Расширение палитры красителей и генетически кодируемых инструментов позволит как увеличить пул информации об участии H_2S и его производных в биологических процессах, так и подобрать потенциальные мишени и препараты для борьбы с различными заболеваниями.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 221500299).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abe K., Kimura H. // J. Neurosci. 1996. V. 16. P. 1066–1071.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-01066.1996>
2. Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R. // EMBO J. 2001. V. 20. P. 6008–6016.
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.6008>
3. Giles G.I., Jacob C. // Biol. Chem. 2002. V. 383. P. 375–388.
<https://doi.org/10.1515/BC.2002.042>
4. Szabó C. // Nat. Rev. Drug Discov. 2007. V. 6. P. 917–935.
<https://doi.org/10.1038/nrd2425>
5. Li L., Rose P., Moore P.K. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2011. V. 51. P. 169–187.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010510-100505>
6. Filipovic M.R., Zivanovic J., Alvarez B., Banerjee R. // Chem. Rev. 2018. V. 118. P. 1253–1337.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00205>
7. Szabo C. // Biochem. Pharmacol. 2018. V. 149. P. 5–19.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.09.010>
8. Cao X., Ding L., Xie Z.Z., Yang Y., Whiteman M., Moore P.K., Bian J.S. // Antioxid. Redox Signal. 2019. V. 31. P. 1–38.
<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7058>
9. Li Q., Lancaster J.R. // Nitric Oxide. 2013. V. 35. P. 21–34.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.07.001>
10. Shen Y., Shen Z., Luo S., Guo W., Zhu Y.Z. // Oxid. Med. Cell Longev. 2015. V. 2015. P. 925167.
<https://doi.org/10.1155/2015/925167>
11. Zhu Y.Z., Wang Z.J., Ho P., Loke Y.Y., Zhu Y.C., Huang S.H., Tan C.S., Whiteman M., Lu J., Moore P.K. // J. Appl. Physiol. 2007. V. 102. P. 261–268.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00096.2006>
12. Hosoki R., Matsuki N., Kimura H. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997. V. 237. P. 527–531.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6878>
13. Sivarajah A., Collino M., Yasin M., Benetti E., Gallicchio M., Mazzon E., Cuzzocrea S., Fantozzi R., Thiemermann C. // Shock. 2009. V. 31. P. 267–274.
<https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318180ff89>
14. Sen N., Paul B.D., Gadalla M.M., Mustafa A.K., Sen T., Xu R., Kim S., Snyder S.H. // Mol. Cell. 2012. V. 45. P. 13–24.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.021>
15. Dilek N., Papapetropoulos A., Toliver-Kinsky T., Szabo C. // Pharmacol. Res. 2020. V. 161. P. 105119.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105119>
16. Wang R. // Physiol. Rev. 2012. V. 92. P. 791–896.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2011>
17. Ono K., Akaike T., Sawa T., Kumagai Y., Wink D.A., Tantillo D.J., Hobbs A.J., Nagy P., Xian M., Lin J., Fukuto J.M. // Free Radic. Biol. Med. 2014. V. 77. P. 82–94.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.007>
18. Singh S., Lin H. // Microorganisms. 2015. V. 3. P. 866–889.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms3040866>
19. Hellmich M.R., Szabo C. // Handb. Exp. Pharmacol. 2015. V. 230. P. 233–241.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-18144-8_12
20. Hershey J.P., Plese T., Millero F.J. // Geochim. Cosmochim. Acta. 1988. V. 52. P. 2047–2051.
[https://doi.org/10.1016/0016-7037\(88\)90183-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(88)90183-4)
21. Fathe K., Holt J.S., Oxley S.P., Pursell C.J. // J. Phys. Chem. A. 2006. V. 110. P. 10793–10798.
<https://doi.org/10.1021/jp0634104>
22. Myers R.J. // J. Chem. Educ. 1986. V. 63. P. 687–690.
<https://doi.org/10.1021/ed063p687>
23. May P.M., Batka D., Hefter G., Königsberger E., Rowland D. // Chem. Commun. 2018. V. 54. P. 1980–1983.
<https://doi.org/10.1039/C8CC00187A>
24. Cuevasanta E., Lange M., Bonanata J., Coitiño E.L., Ferrer-Sueta G., Filipovic M.R., Alvarez B. // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. P. 26866–26880.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.672816>
25. Armstrong D.A., Huie R.E., Koppenol W.H., Lyman S.V., Merenyi G., Neta P., Ruscic B., Stanbury D.M., Steenken S., Wardman P. // Pure Appl. Chem. 2015. V. 87. P. 1139–1150.
<https://doi.org/10.1515/pac-2014-0502>
26. Koppenol W.H., Bounds P.L. // Arch. Biochem. Biophys. 2017. V. 617. P. 3–8.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.09.012>
27. Wedmann R., Zahl A., Shubina T.E., Dürr M., Heinemann F.W., Bugenhagen B.E.C., Burger P., Ivanovic-Burmazovic I., Filipovic M.R. // Inorg. Chem. 2015. V. 54. P. 9367–9380.
<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b00831>

28. Kolluru G.K., Shen X., Kevil C.G. // *Redox Biol.* 2013. V.1. P. 313–318.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.05.001>
29. Miranda K.M., Paolocci N., Katori T., Thomas D.D., Ford E., Bartberger M.D., Espey M.G., Kass D.A., Feelisch M., Fukuto J.M., Wink D.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 9196–9201.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1430507100>
30. Mathai J.C., Missner A., Kügler P., Saparov S.M., Zeidel M.L., Lee J.K., Pohl P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 16633–16638.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0902952106>
31. Gadalla M.M., Snyder S.H. // *J. Neurochem.* 2010. V. 113. P. 14–26.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06580.x>
32. Kabil O., Banerjee R. // *Antioxid. Redox Signal.* 2014. V. 20. P. 770–782.
<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5339>
33. Paul B.D., Snyder S.H. // *Trends Biochem. Sci.* 2015. V. 40. P. 687–700.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.08.007>
34. Banerjee R., Zou C.G. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2005. V. 433. P. 144–156.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.08.037>
35. Singh S., Madzellan P., Banerjee R. // *Nat. Prod. Rep.* 2007. V. 24. P. 631–639.
<https://doi.org/10.1039/b604182p>
36. Vicente J.B., Colaço H.G., Sarti P., Leandro P., Giuffrè A. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. P. 572–581.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.681221>
37. Vitvitsky V., Thomas M., Ghorpade A., Gendelman H.E., Banerjee R. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 35785–35793.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M602799200>
38. Kimura H. // *Exp. Physiol.* 2011. V. 96. P. 833–835.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.057455>
39. Chiku T., Padovani D., Zhu W., Singh S., Vitvitsky V., Banerjee R. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 11601–11612.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M808026200>
40. Yang G., Wu L., Jiang B., Yang W., Qi J., Cao K., Meng Q., Mustafa A.K., Mu W., Zhang S., Snyder S.H., Wang R. // *Science.* 2008. V. 322. P. 587–590.
<https://doi.org/10.1126/science.1162667>
41. Huang J., Niknahad H., Khan S., O'Brien P.J. // *Biochem. Pharmacol.* 1998. V. 55. P. 1983–1990.
[https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00072-0](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00072-0)
42. Westrop G.D., Georg I., Coombs G.H. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 33485–33494.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.054320>
43. Kolluru G.K., Shen X., Bir S.C., Kevil C.G. // *Nitric Oxide.* 2013. V. 35. P. 5–20.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.07.002>
44. Domán A., Dóka É., Garai D., Bogdándi V., Balla G., Balla J., Nagy P. // *Redox Biol.* 2023. V. 60. P. 102617.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102617>
45. Pietri R., Román-Morales E., López-Garriga J. // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. V. 15. P. 393–404.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3698>
46. Nicholls P., Kim J.K. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1981. V. 637. P. 312–320.
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(81\)90170-5](https://doi.org/10.1016/0005-2728(81)90170-5)
47. Collman J.P., Ghosh S., Dey A., Decréau R.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 22090–22095.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0904082106>
48. Nicholls P. // *Biochem. Soc. Trans.* 1975. V. 3. P. 316–319.
<https://doi.org/10.1042/bst0030316>
49. Vitvitsky V., Yadav P.K., An S., Seravalli J., Cho U.S., Banerjee R. // *J. Biol. Chem.* 2017. V. 292. P. 5584–5592.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.774943>
50. Goubern M., Andriamihaja M., Nübel T., Blanchier F., Bouillaud F. // *FASEB J.* 2007. V. 21. P. 1699–1706.
<https://doi.org/10.1096/fj.06-7407com>
51. Kabil O., Banerjee R. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 21903–21907.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R110.128363>
52. Pedre B., Talwar D., Barayeu U., Schilling D., Luzarowski M., Sokolowski M., Glatt S., Dick T.P. // *Nat. Chem. Biol.* 2023. V. 19. P. 507–517.
<https://doi.org/10.1038/s41589-022-01244-8>
53. Bianco C.L., Akaike T., Ida T., Nagy P., Bogdándi V., Toscano P., Kumagai Y., Henderson C.F., Goddu R.N., Lin J., Fukuto J.M. // *Br. J. Pharmacol.* 2019. V. 176. P. 671–683.
<https://doi.org/10.1111/bph.14372>
54. Toohey J.I., Cooper A.J.L. // *Molecules.* 2014. V. 19. P. 12789–12813.
<https://doi.org/10.3390/molecules190812789>

55. Jüdes A., Bruch A., Klassen R., Helm M., Schaf-frath R. // *Microb. Cell.* 2016. V. 3. P. 554–564. <https://doi.org/10.15698/mic2016.11.539>
56. Kimura Y., Koike S., Shibuya N., Lefer D., Ogasa-wara Y., Kimura H. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 10459. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11004-7>
57. Zhang D., MacInkovic I., Devarie-Baez N.O., Pan J., Park C.M., Carroll K.S., Filipovic M.R., Xian M. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014. V. 53. P. 575–581. <https://doi.org/10.1002/anie.201305876>
58. Cortese-Krott M.M., Fernandez B.O., Santos J.L.T., Mergia E., Grman M., Nagy P., Kelm M., But-ler A., Feelisch M. // *Redox Biol.* 2014. V. 2. P. 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.031>
59. Akaike T., Ida T., Wei F.Y., Nishida M., Kumagai Y., Alam M.M., Ihara H., Sawa T., Matsunaga T., Kasa-matsu S., Nishimura A., Morita M., Tomizawa K., Nishimura A., Watanabe S., Inaba K., Shima H., Tanuma N., Jung M., Fujii S., Watanabe Y., Ohmu-rya M., Nagy P., Feelisch M., Fukuto J.M., Moto-hashii H. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 1177. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01311-y>
60. Mishanina T.V., Libiad M., Banerjee R. // *Nat. Chem. Biol.* 2015. V. 11. P. 457–464. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1834>
61. Toohey J.I. // *Anal. Biochem.* 2011. V. 413. P. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.01.044>
62. Fukuto J.M., Ignarro L.J., Nagy P., Wink D.A., Ke-vil C.G., Feelisch M., Cortese-Krott M.M., Bianco C.L., Kumagai Y., Hobbs A.J., Lin J., Ida T., Akaike T. // *FEBS Lett.* 2018. V. 592. P. 2140–2152. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13090>
63. Kimura H. // *Molecules.* 2014. V. 19. P. 16146–16157. <https://doi.org/10.3390/molecules191016146>
64. Ida T., Sawa T., Ihara H., Tsuchiya Y., Watanabe Y., Kumagai Y., Suematsu M., Motohashii H., Fujii S., Matsunaga T., Yamamoto M., Ono K., Devarie-Baez N.O., Xian M., Fukuto J.M., Akaike T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. P. 7606–7611. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321232111>
65. Wedmann R., Onderka C., Wei S., Szijártó I.A., Miljkovic J.L., Mitrovic A., Lange M., Savitsky S., Yadav P.K., Torregrossa R., Harrer E.G., Harrer T., Ishii I., Gollasch M., Wood M.E., Galardon E., Xian M., Whiteman M., Banerjee R., Filipovic M.R. // *Chem. Sci.* 2016. V. 7. P. 3414–3426. <https://doi.org/10.1039/C5SC04818D>
66. Dóka É., Pader I., Biró A., Johansson K., Cheng Q., Ballagó K., Prigge J.R., Pastor-Flores D., Dick T.P., Schmidt E.E., Arnér E.S.J., Nagy P. // *Sci. Adv.* 2016. V. 2. P. 1500968. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500968>
67. O'Neill L.A.J., Kaltschmidt C. // *Trends Neurosci.* 1997. V. 20. P. 252–258. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)01035-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)01035-1)
68. Lee Z.W., Teo X.Y., Tay E.Y.W., Tan C.H., Hagen T., Moore P.K., Deng L.W. // *Br. J. Pharmacol.* 2014. V. 171. P. 4322–4336. <https://doi.org/10.1111/bph.12773>
69. Zhao K., Ju Y., Li S., Altaany Z., Wang R., Yang G. // *EMBO Rep.* 2014. V. 15. P. 792–800. <https://doi.org/10.1002/embr.201338213>
70. Jiang B., Tang G., Cao K., Wu L., Wang R. // *Antioxid. Redox Signal.* 2010. V. 12. P. 1167–1178. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2894>
71. Shaidullov I.F., Shafigullin M.U., Gabitova L.M., Sitdikov F.G., Zefirov A.L., Sitdikova G.F. // *J. Evol. Biochem. Phys.* 2018. V. 54. P. 400–407. <https://doi.org/10.1134/S0022093018050083>
72. Papapetropoulos A., Pyriochou A., Altaany Z., Yang G., Marazioti A., Zhou Z., Jeschke M.G., Bran-ski L.K., Herndon D.N., Wang R., Szabó C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 21972–21977. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908047106>
73. Eberhardt M., Dux M., Namer B., Miljkovic J., Cordasic N., Will C., Kichko T.I., de la Roche J., Fischer M., Suárez S.A., Bikiel D., Dorsch K., Leffler A., Babes A., Lampert A., Lennerz J.K., Jacobi J., Martí M.A., Doctorovich F., Höges-tätt E.D., Zygmunt P.M., Ivanovic-Burmazovic I., Messlinger K., Reeh P., Filipovic M.R. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 4381. <https://doi.org/10.1038/ncomms5381>
74. Altaany Z., Ju Y., Yang G., Wang R. // *Sci. Signal.* 2014. V. 7. P. ra87. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005478>
75. Bucci M., Papapetropoulos A., Vellecco V., Zhou Z., Zaid A., Giannogonas P., Cantalupo A., Dhayade S., Karalis K.P., Wang R., Feil R., Cirino G. // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. e53319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053319>
76. Paulsen C.E., Truong T.H., Garcia F.J., Homann A., Gupta V., Leonard S.E., Carroll K.S. // *Nat. Chem. Biol.* 2011. V. 8. P. 57–64. <https://doi.org/10.1038/nchembio.736>

77. Zivanovic J., Kouroussis E., Kohl J.B., Adhikari B., Bursac B., Schott-Roux S., Petrovic D., Miljkovic J.L., Thomas-Lopez D., Jung Y., Miler M., Mitchell S., Milosevic V., Gomes J.E., Benhar M., Gonzales-Zorn B., Ivanovic-Burmazovic I., Torregrossa R., Mitchell J.R., Whiteman M., Schwarz G., Snyder S.H., Paul B.D., Carroll K.S., Filipovic M.R. // *Cell Metab.* 2019. V. 30. P. 1152–1170.e13.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.10.007>
78. Tao B.-B., Liu S.-Y., Zhang C.-C., Fu W., Cai W.-J., Wang Y., Shen Q., Wang M.-J., Chen Y., Zhang L.-J., Zhu Y.-Z., Zhu Y.-C. // *Antioxid. Redox Signal.* 2013. V. 19. P. 448–464.
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.4565>
79. Wu D., Hu Q., Zhu D. // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2018. P. 4579140.
<https://doi.org/10.1155/2018/4579140>
80. Kolluru G.K., Shackelford R.E., Shen X., Dominic P., Kevil C.G. // *Nat. Rev. Cardiol.* 2023. V. 20. P. 109–125.
<https://doi.org/10.1038/s41569-022-00741-6>
81. Robert K., Vialard F., Thierry E., Toyama K., Sinet P.-M., Janel N., London J. // *J. Histochem. Cytochem.* 2003. V. 51. P. 363–371.
<https://doi.org/10.1177/002215540305100311>
82. Luo H., Wu P.-F., Han Q.-Q., Cao Y., Deng S.-L., Wang J., Deng Q., Wang F., Chen J.-G. // *Antioxid. Redox Signal.* 2019. V. 30. P. 1880–1899.
<https://doi.org/10.1089/ars.2018.7503>
83. García-Bereguiaín M.A., Samhan-Arias A.K., Martín-Romero F.J., Gutiérrez-Merino C. // *Antioxid. Redox Signal.* 2008. V. 10. P. 31–42.
<https://doi.org/10.1089/ars.2007.1656>
84. Han Y., Qin J., Chang X., Yang Z., Tang X., Du J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 327. P. 431–436.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.028>
85. Rangel-Galván M., Rangel-Galván V., Rangel-Huerta A. // *Front. Pharmacol.* 2023. V. 14. P. 1212800.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1212800>
86. Tsubota-Matsunami M., Noguchi Y., Okawa Y., Sekiguchi F., Kawabata A. // *J. Pharmacol. Sci.* 2012. V. 119. P. 293–296.
<https://doi.org/10.1254/jphs.12086sc>
87. Lu M., Choo C.H., Hu L.-F., Tan B.H., Hu G., Bian J.-S. // *Neurosci. Res.* 2010. V. 66. P. 92–98.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.09.1713>
88. Whiteman M., Cheung N.S., Zhu Y.-Z., Chu S.H., Siau J.L., Wong B.S., Armstrong J.S., Moore P.K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 326. P. 794–798.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.110>
89. Tyagi N., Moshal K.S., Sen U., Vacek T.P., Kumar M., Hughes W.M., Kundu S., Tyagi S.C. // *Antioxid. Redox Signal.* 2009. V. 11. P. 25–33.
<https://doi.org/10.1089/ars.2008.2073>
90. Giuliani D., Ottani A., Zaffe D., Galantucci M., Strinati F., Lodi R., Guarini S. // *Neurobiol. Learn Mem.* 2013. V. 104. P. 82–91.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.05.006>
91. Zhang H., Gao Y., Zhao F., Dai Z., Meng T., Tu S., Yan Y. // *Neurochem. Int.* 2011. V. 58. P. 169–175.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.11.010>
92. Liu Y.-Y., Bian J.-S. // *J. Alzheimers Dis.* 2010. V. 22. P. 1189–1200.
<https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101002>
93. Nagpure B.V., Bian J.-S. // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e88508.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088508>
94. Sbodio J.I., Snyder S.H., Paul B.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 8843–8848.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1608264113>
95. Vandiver M.S., Paul B.D., Xu R., Karuppagounder S., Rao F., Snowman A.M., Seok Ko H., Il Lee Y., Dawson V.L., Dawson T.M., Sen N., Snyder S.H. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 1626.
<https://doi.org/10.1038/ncomms2623>
96. Sun H.-J., Wu Z.-Y., Nie X.-W., Bian J.-S. // *Curr. Neuropharmacol.* 2021. V. 19. P. 868–884.
<https://doi.org/10.2174/1570159X18666200905143550>
97. Yang W., Yang G., Jia X., Wu L., Wang R. // *J. Physiol.* 2005. V. 569. P. 519–531.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.097642>
98. Yang G., Yang W., Wu L., Wang R. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 16567–16576.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M700605200>
99. Pahwa R., Goyal A., Jialal I. // *Chronic Inflammation / In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.*
100. Soomro S. // *Open J. Immunol.* 2019. V. 9. P. 1–20.
<https://doi.org/10.4236/oji.2019.91001>
101. Trummer M., Galardon E., Mayer B., Steiner G., Stamm T., Kloesch B. // *Nitric Oxide.* 2022. V. 129. P. 41–52.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2022.09.005>

102. Zhang T., Tsutsuki H., Ono K., Akaike T., Sawa T. // J. Clin. Biochem. Nutr. 2021. V. 1. P. 5–8.
<https://doi.org/10.3164/jcbrn.20-13>
103. Arsenijevic D., Stojanovic B., Milovanovic J., Arsenijevic A., Simic M., Pergal M., Kodranov I., Cvetkovic O., Vojvodic D., Ristanovic E., Manojlovic D., Milovanovic M., Arsenijevic N. // Nutrients. 2021. V. 13. P. 1022.
<https://doi.org/10.3390/nu13031022>
104. Tamizhselvi R., Moore P.K., Bhatia M. // Pancreas. 2008. V. 4. P. e24–e31.
<https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e31816857bb>
105. Bhatia M., Gaddam R.R. // Antioxid. Redox Signal. 2021. V. 34. P. 1368–1377.
<https://doi.org/10.1089/ars.2020.8211>
106. Norris E.J., Culbertson C.R., Narasimhan S., Clemens M.G. // Shock. 2011. V. 3. P. 242–250.
<https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3182252ee7>
107. Mani S., Cao W., Wu L., Wang R. // Nitric Oxide. 2014. V. 41. P. 62–71.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.02.006>
108. Sun H.-J., Wu Z.-Y., Nie X.-W., Wang X.-Y., Bian J.-S. // J. Adv. Res. 2021. V. 27. P. 127–135.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.05.010>
109. Tan G., Pan S., Li J., Dong X., Kang K., Zhao M., Jiang X., Kanwar J.R., Qiao H., Jiang H., Sun X. // PLoS One. 2011. V. 6. P. e25943.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025943>
110. Xia M., Chen L., Muh R.W., Li P.L., Li N. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2009. V. 329. P. 1056–62.
<https://doi.org/10.1124/jpet.108.149963>
111. Nagahara N., Ito T., Kitamura H., Nishino T. // Histochemistry. 1998. V. 110. P. 243–250.
<https://doi.org/10.1007/s004180050286>
112. Bos E.M., Wang R., Snijder P.M., Boersema M., Damman J., Fu M., Moser J., Hillebrands J.L., Ploeg R.J., Yang G., Leuvenink H.G., van Goor H. // J. Am. Soc. Nephrol. 2013. V. 5. P. 759–770.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2012030268>
113. Feng J., Lu X., Li H., Wang S. // Ren. Fail. 2022. V. 44. P. 1290–1309.
<https://doi.org/10.1080/0886022X.2022.2107936>
114. Shiota M., Naya M., Yamamoto T., Hishiki T., Tani T., Takahashi H., Kubo A., Koike D., Itoh M., Ohmura M., Kabe Y., Sugiura Y., Hiraoka N., Morikawa T., Takubo K., Suina K., Nagashima H., Sampetean O., Nagano O., Saya H., Yamazoe S., Watanabe H., Suematsu M. // Nat. Commun. 2018. V. 9. P. 1561.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03899-1>
115. Honda K., Hishiki T., Yamamoto S., Yamamoto T., Miura N., Kubo A., Itoh M., Chen W.-Y., Takano M., Yoshikawa T., Kasamatsu T., Sonoda S., Yoshizawa H., Nakamura S., Itai Y., Shiota M., Koike D., Naya M., Hayakawa N., Naito Y., Matsuura T., Iwaisako K., Masui T., Uemoto S., Nagashima K., Hashimoto Y., Sakuma T., Matsubara O., Huang W., Ida T., Akaike T., Masugi Y., Sakamoto M., Kato T., Ino Y., Yoshida H., Tsuda H., Hiraoka N., Kabe Y., Suematsu M. // Redox Biol. 2021. V. 41. P. 101926.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101926>
116. Yu F., Han X., Chen L. // Chem. Commun. 2014. V. 50. P. 12234–12249.
<https://doi.org/10.1039/C4CC03312D>
117. Lin V.S., Lippert A.R., Chang C.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 7131–7135.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1302193110>
118. Lippert A.R., New E.J., Chang C.J. // J. Am. Chem. Soc. 2011. V. 133. P. 10078–10080.
<https://doi.org/10.1021/ja203661j>
119. Wu M.-Y., Li K., Hou J.-T., Huang Z., Yu X.-Q. // Org. Biomol. Chem. 2012. V. 10. P. 8342–8347.
<https://doi.org/10.1039/C2OB26235E>
120. Liu C., Pan J., Li S., Zhao Y., Wu L.Y., Berkman C.E., Whorton A.R., Xian M. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2011. V. 50. P. 10327–10329.
<https://doi.org/10.1002/anie.201104305>
121. Liu J., Sun Y.-Q., Zhang J., Yang T., Cao J., Zhang L., Guo W. // Chemistry. 2013. V. 19. P. 4717–4722.
<https://doi.org/10.1002/chem.201300455>
122. Chen Y., Zhu C., Yang Z., Chen J., He Y., Jiao Y., He W., Qiu L., Cen J., Guo Z. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2013. V. 52. P. 1688–1691.
<https://doi.org/10.1002/anie.201207701>
123. Pak Y.L., Li J., Ko K.C., Kim G., Lee J.Y., Yoon J. // Anal. Chem. 2016. V. 88. P. 5476–5481.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00956>
124. Smith R.M., Martell A.E. // Critical Stability Constants. New York: Springer, 1976.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5506-0>
125. Sasakura K., Hanaoka K., Shibuya N., Mikami Y., Kimura Y., Komatsu T., Ueno T., Terai T., Kimura H., Nagano T. // J. Am. Chem. Soc. 2011. V. 133. P. 18003–18005.
<https://doi.org/10.1021/ja207851s>
126. Kaushik R., Ghosh A., Amilan Jose D. // Coord. Chem. Rev. 2017. V. 347. P. 141–157.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.07.003>

127. Gao M., Wang R., Yu F., Li B., Chen L. // *J. Mater. Chem. B*. 2018. V. 6. P. 6637–6645.
<https://doi.org/10.1039/c8tb01794h>
128. Gao M., Wang R., Yu F., You J., Chen L. // *J. Mater. Chem. B*. 2018. V. 6. P. 2608–2619.
<https://doi.org/10.1039/c7tb03200e>
129. Echizen H., Sasaki E., Hanaoka K. // *Biomolecules*. 2021. V. 11. P. 1553.
<https://doi.org/10.3390/biom11111553>
130. Chen S., Chen Z., Ren W., Ai H. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. P. 9589–9592.
<https://doi.org/10.1021/ja303261d>
131. Hu X., Li H., Zhang X., Chen Z., Zhao R., Hou N., Liu J., Xun L., Liu H. // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. P. 3893–3901.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04634>
132. Li Z., Wang Q., Xia Y., Xun L., Liu H. // *Antioxidants*. 2020. V. 9. P. 985.
<https://doi.org/10.3390/antiox9100985>
133. Müller A., Schneider J.F., Degrossoli A., Lupilova N., Dick T.P., Leichert L.I. // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. V. 106. P. 329–338.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.044>
134. Paulsen C.E., Carroll K.S. // *Chem. Rev.* 2013. V. 113. P. 4633–4679.
<https://doi.org/10.1021/cr300163e>
135. Nagy P., Pálkás Z., Nagy A., Budai B., Tóth I., Vasas A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1840. P. 876–891.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.037>
136. Xu T., Scafa N., Xu L.-P., Zhou S., Al-Ghanem K.A., Mahboob S., Fugetsu B., Zhang X. // *Analyst*. 2016. V. 141. P. 1185–1195.
<https://doi.org/10.1039/C5AN02208H>
137. Ibrahim H., Serag A., Farag M.A. // *J. Adv. Res.* 2021. V. 27. P. 137–153.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.05.018>
138. Quan F.-S., Lee G.-J. // *Biomed. Res. Int.* 2021. V. 2021. P. 5473965.
<https://doi.org/10.1155/2021/5473965>
139. Haddad P.R., Heckenberg A.L. // *J. Chromatogr.* 1988. V. 447. P. 415–420.
[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(88\)90054-4](https://doi.org/10.1016/0021-9673(88)90054-4)
140. Vitvitsky V., Banerjee R. // *Methods Enzymol.* 2015. V. 554. P. 111–123.
<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.013>
141. Wintner E.A., Deckwerth T.L., Langston W., Bengtsson A., Leviten D., Hill P., Insko M.A., Dumpit R., VandenEckart E., Toombs C.F., Szabo C. // *Br. J. Pharmacol.* 2010. V. 160. P. 941–957.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00704.x>
142. Wedding R.T. // *Methods Enzymol.* 1987. V. 143. P. 29–31.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)43010-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)43010-3)
143. Doeller J.E., Isbell T.S., Benavides G., Koenitzer J., Patel H., Patel R.P., Lancaster J.R., Darley-Usmar V.M., Kraus D.W. // *Anal. Biochem.* 2005. V. 341. P. 40–51.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.03.024>
144. Whitfield N.L., Kreimier E.L., Verdial F.C., Skovgaard N., Olson K.R. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008. V. 294. P. R1930–R1937.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00025.2008>
145. Furne J., Saeed A., Levitt M.D. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008. V. 295. P. R1479–R1485.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.90566.2008>
146. Wood J.L. // *Methods Enzymol.* 1987. V. 143. P. 25–29.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)43009-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)43009-7)
147. Numakura T., Sugiura H., Akaike T., Ida T., Fujii S., Koarai A., Yamada M., Onodera K., Hashimoto Y., Tanaka R., Sato K., Shishikura Y., Hirano T., Yanagisawa S., Fujino N., Okazaki T., Tamada T., Hoshikawa Y., Okada Y., Ichinose M. // *Thorax*. 2017. V. 72. P. 1074–1083.
<https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209359>
148. Liu C., Zhang F., Munske G., Zhang H., Xian M. // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. V. 76. P. 200–207.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.003>
149. Hannestad U., Margheri S., Sörbo B. // *Anal. Biochem.* 1989. V. 178. P. 394–398.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90659-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90659-3)
150. Mustafa A.K., Gadalla M.M., Sen N., Kim S., Mu W., Gazi S.K., Barrow R.K., Yang G., Wang R., Snyder S.H. // *Sci. Signal.* 2009. V. 2. P. ra72.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2000464>
151. Pan J., Carroll K.S. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. P. 1110–1116.
<https://doi.org/10.1021/cb4001052>
152. Smyth D., Blumenfeld O., Konigsberg W. // *Biochem. J.* 1964. V. 91. P. 589–595.
<https://doi.org/10.1042/bj0910589>

153. Gao X.-H., Krokowski D., Guan B.-J., Bederman I., Majumder M., Parisien M., Diatchenko L., Kabil O., Willard B., Banerjee R., Wang B., Bebek G., Evans C.R., Fox P.L., Gerson S.L., Hoppel C.L., Liu M., Arvan P., Hatzoglou M. // *eLife*. 2015. V. 4. P. e10067.
<https://doi.org/10.7554/eLife.10067>
154. Longen S., Richter F., Köhler Y., Wittig I., Beck K.-F., Pfeilschifter J. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 29808.
<https://doi.org/10.1038/srep29808>
155. Iciek M., Bilka-Wilkosz A., Kozdrowicki M., Górný M. // *Biosci. Rep.* 2022. V. 42. P. BSR20221006.
<https://doi.org/10.1042/BSR20221006>
156. Li M., Mao J., Zhu Y. // *Antioxid. Redox Signal.* 2021. V. 35. P. 341–356.
<https://doi.org/10.1089/ars.2020.8249>
157. Magli E., Perissutti E., Santagada V., Caliendo G., Corvino A., Esposito G., Esposito G., Fiorino F., Migliaccio M., Scognamiglio A., Severino B., Sparaco R., Frecentese F. // *Biomolecules*. 2021. V. 11. P. 1899.
<https://doi.org/10.3390/biom11121899>

Biochemistry of Redox-Active Sulphur Compounds in Mammalian Cells and Approaches to Detecting Them

R. I. Raevsky*, **, V. A. Katrukha*, ***, Y. V. Khramova*, ***,[#], and D. S. Bilan*, **,[#]

[#] E-mail: d.s.bilan@gmail.com; yul.khramova@gmail.com

* *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

** *Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia*

*** *Faculty of Biology, Department of Biochemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1/12, Moscow, 119234 Russia*

The discovery of new classes of regulatory molecules in human and animal metabolism always leads to a large-scale study of their properties in the context of biochemistry, physiology, and pharmacology. About 20 years ago, hydrogen sulfide (H₂S) and its derivatives – active sulfur forms (ASFs): persulfides, polysulfides, nitrosothiols, sulfenic acids, etc. – became one of such classes of molecules. The participation of ASFs in a variety of physiological and pathological processes, such as regulation of vascular tone, inflammation, long-term potentialization in the central nervous system, etc., has been shown. Changes in ASF levels or patterns of modification of their targets are associated with a wide range of pathologies: cardiovascular, oncologic, neurodegenerative, and others. For a part of these processes, mechanisms have been studied that involve direct modification of regulatory (NF-κB, Keap1) or effector (GAFD, eNOS, TRPA1) proteins through reactions of cysteine residues and metal-containing centers with APS. The presence of different regulated enzymatic systems producing APS and numerous molecular targets allows us to consider H₂S and its derivatives as an important class of small regulatory molecules. H₂S is counted among the so-called “gas transmitters”, along with nitric oxide(II) and carbon monoxide. Over the last 20 years, a huge amount of data on the biochemistry of these compounds and approaches to their study has been accumulated.

Keywords: H₂S, polysulfides, persulfides, reactive sulfur species (RSS), persulfidation, detection of RSS



УДК 57.086.2

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ НАНОСКОПИИ В БИОЛОГИИ

© 2024 г. Д. О. Соловьева*, #, А. В. Алтунина*, **, М. В. Третьяк*,
К. Е. Мочалов*, В. А. Олейников*, ***

* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский переулок, 9

*** Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”,
Россия, 115409 Москва, Каширское ш., 31

Поступила в редакцию 12.10.2023 г.

После доработки 29.11.2023 г.

Принята к публикации 30.11.2023 г.

За последние десятилетия оптическая микроскопия претерпела значительные изменения благодаря преодолению дифракционного предела оптического разрешения и развитию методов визуализации с высоким разрешением, которые объединили под термином флуоресцентная наноскопия. Такие подходы позволяют исследователям наблюдать биологические структуры и процессы с наномасштабным уровнем детализации, раскрывая их ранее скрытые особенности и помогая отвечать на фундаментальные биологические вопросы. Среди передовых методов флуоресцентной наноскопии можно выделить STED (Stimulated Emission Depletion Microscopy), STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy), PALM (Photo-activated Localization Microscopy), TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence), SIM (Structured Illumination Microscopy), MINFLUX (Minimal Photon Fluxes), PAINT (Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography) и RESOLFT (REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions) и др. Большинство указанных методов позволяют получать объемные (3D) изображения исследуемых объектов. В данном обзоре рассмотрены принципы этих методов, их достоинства и недостатки, а также применение в биологических исследованиях.

Ключевые слова: оптическая микроскопия, флуоресцентная микроскопия, сверхвысокое разрешение, флуоресцентная наноскопия, дифракционный предел

DOI: 10.31857/S0132342324040077, **EDN:** MWYVNA

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	463
2. МЕТОДЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ НАНОСКОПИИ STED	465
3. RESOLFT	467
4. STORM	468
5. PALM	470
6. PAINT	471
7. MINFLUX	472
8. SIM	474
9. RIM	476
10. TIRF	477
11. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	479
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	479

1. ВВЕДЕНИЕ

В обзоре рассмотрен ряд методов флуоресцентной наноскопии (оптической флуоресцентной микроскопии с наномасштабным разрешением): микроскопия со структурированным освещением (Structured Illumination Microscopy, SIM), микроскопия с истощением стимулированного излучения (Stimulated Emission Depletion Microscopy, STED), микроскопия стохастической оптической реконструкции (STochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM), фотоактивируемая локализационная микроскопия (Photo-activated Localization Microscopy, PALM), микроскопия обратимых насыщаемых оптических флуоресцентных переходов (REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions, RESOLFT), наноскопия с минимальными потоками фотонов (Minimal Photon Fluxes, MINFLUX), флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения (Total Internal Reflection Fluorescence, TIRF), накопление точек для визуализа-

ции в наноразмерной топографии (Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography, PAINT).

Все эти методы используют флуорофоры, которые поглощают фотоны в “основном” состоянии и испускают флуоресценцию в “возбужденном” состоянии, что позволяет улучшить контраст во флуоресцентной микроскопии. Изначально флуоресцентная микроскопия имела ограничение оптического разрешения, связанное с числовой апертурой объектива и длиной волны света, которое было описано Эрнстом Аббе [1]. Так, разрешение светового оптического микроскопа определяется следующим образом. Поскольку световая волна может быть дифрагированной, функция трехмерного рассеяния точки (Point Spread Function, PSF), создаваемая точечным объектом, имеет конечный размер. Основываясь на конструктивной интерференции в пространстве, полная ширина на полувысоте (Full Width At Half Maximum, FWHM) PSF составляет $\Delta r \approx \lambda / (2\eta \times \sin\alpha)$ в фокальной плоскости и $\Delta l \approx \lambda / (\eta \times \sin 2\alpha)$ вдоль оптической оси, где λ – длина волны света, α – апер-

Сокращения: ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2); FWHM – полная ширина на уровне половины высоты (Full Width at Half Maximum); HS-SIM – высокоскоростная микроскопия структурированного освещения (High Speed SIM); iPALM – интерферометрическая фотоактивируемая локализационная микроскопия (Interferometric Photoactivated Localization Microscopy); LIVE-PAINT – визуализация живых клеток с использованием накопления точек обратимых взаимодействий для визуализации в наномасштабной топографии (Live cell Imaging using reversible interactions Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography); MAI-SIM – интерферометрическая микроскопия со структурированным освещением на основе машинного обучения (Machine Learning Assisted Interferometric Structured Illumination Microscopy); MA-TIRF – многоугольная флуоресценция полного внутреннего отражения (Multiangle Total Internal Reflection Fluorescence); MICOS – место контакта митохондрий и кристы с внешней мембраной (Mitochondria Contact Site and Cristae to Outer Membrane); MINFLUX – минимальные флуктуации фотонов (MINimal photon FLUXes); NA – числовая апертура (Numerical Aperture); PAFP – фотоактивируемый флуоресцентный белок (Photoactivatable Fluorescent Protein); PAINT – накопление точек для визуализации наномасштабной топографии (Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography); PALM – фотоактивируемая локализационная микроскопия (Photo-activated Localization Microscopy); PIEZO – механочувствительный компонент ионного канала пьезотипа (Piezo Type Mechanosensitive Ion Channel Component); pPAINT – накопление белковых точек для визуализации наномасштабной топографии (Protein Point Accumulation in Nanoscale Topography); PSF – функция рассеяния точки (Point Spread Function); RAIN-STORM – быстрая визуализация тканей с помощью наномасштабной микроскопии стохастической оптической реконструкции (Rapid Imaging of Tissues at the Nanoscale); RBD – рецептор-связывающий домен (Receptor-Binding Domain); RESOLFT – обратимые насыщающиеся оптические флуоресцентные переходы (REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions); RIM – микроскопия случайного освещения (Random Illumination Microscopy); SARS-CoV-2 – коронавирус 2, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом (Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus 2); SIM – микроскопия структурированного освещения (Structured Illumination Microscopy); SIMPLER – микроскопия сверхкритического освещения, фотометрическая z-локализация с повышенным разрешением (Supercritical Illumination Microscopy Photometric z-Localization with Enhanced Resolution); SMLM – микроскопия локализации одиночных молекул (Single-Molecule Localization Microscopy); SR-SIM – высокоразрешающая микроскопия структурированного освещения (Super Resolution-Structured Illumination Microscopy); STED – микроскопия на основе подавления спонтанного испускания (Stimulated Emission Depletion Microscopy); STORM – микроскопия стохастической оптической реконструкции (STochastic Optical Reconstruction Microscopy); TIRF – флуоресценция полного внутреннего отражения (Total Internal Reflection Fluorescence); ЭМ – электронная микроскопия.

Автор для связи: (тел.: +7 (965) 392-24-91; эл. почта: d.solovieva@mail.ru).

турный угол объектива, η – показатель преломления иммерсионной среды; Δr – FWHM PSF в латеральных направлениях, Δl – FWHM PSF в аксиальных направлениях. Как показано на рис. 1, при визуализации в видимом свете ($\lambda = 632.8$ нм) и масляном иммерсионном объективе с числовой апертурой (Numerical aperture, NA) 1.40 ($NA = \eta \times \sin\alpha$) поперечный размер PSF составляет ~ 226 нм, а аксиальный размер PSF – ~ 487 нм. Таким образом, ограниченная дифракция света приводит к низкому разрешению структур, лежащих за дифракционным пределом, что создает проблемы для детекции молекулярных структур.

С середины XX века было введено несколько подходов, включая конфокальную флуоресцентную микроскопию [2] и многофотонную микроскопию [3], для уменьшения расфокусированного фона флуоресценции. Конфокальная флуоресцентная микроскопия улучшает пространственное разрешение в $\sqrt{2}$ раза по сравнению с традиционной флуоресцентной микроскопией, но на практике одно- и двухфотонная флуоресцентная конфокальная микроскопия обеспечивают практически одинаковое разрешение из-за конечного размера детектора. Однако в начале 1990-х гг. были разработаны базовые концепции, которые позволяют превзойти предел оптической дифракции в флуоресцентной микроскопии дальнего поля, в частности 4Pi-микроскопия, в которой за счет расширения волнового фронта освещения или обнаружения латеральное разрешение варьируется от 80 до 150 нм [4, 5].

Методы микроскопии сверхвысокого разрешения можно разделить на две группы (рис. 2). Первая группа (детерминированные методы) включает микроскопию структурированного освещения и ее производные, в которой для преодоления дифракционного предела используются волновая оптика и обработка изображений. Вторая группа (стохастические методы) – методы, преодолевающие дифракционный предел за счет преимуществ фотопереключаемых флуоресцентных маркеров. Ко второй группе относится локализационная микроскопия одиночных молекул (Single-Molecule Localization Microscopy, SMLM) [6], которая охватывает целый ряд методов, например, STORM и PALM, которые улучшают разрешение за счет случайного включения и выключения излучения одной молекулы в дифракционно ограниченном объеме в разные моменты времени и детекции, т.е. в области дифракционного предела свет излучает только одна молекула, и в дальнейшем регистрируются разные наборы молекул. SMLM генерирует большие объемы данных в виде 2D- или 3D-облаков точек с миллионами локализаций и связанными с ними неопределенностями.

SMLM применяется во многих областях биологии и медицины, таких как изучение онкологических заболеваний, клеточного иммунитета, патогенеза неврологических заболеваний и разработка связанных с ними лекарственных препаратов [7, 8], исследования в клеточной биологии [9].

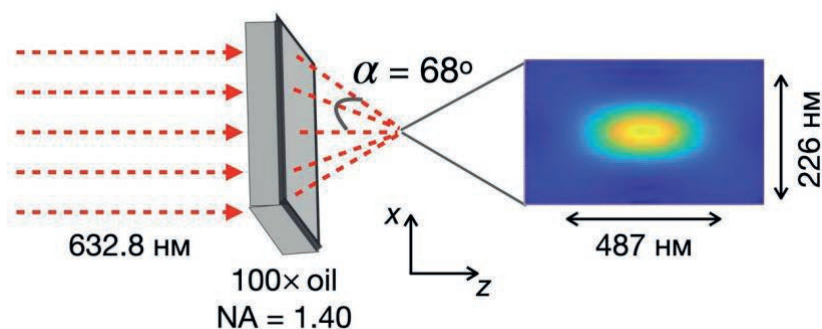


Рис. 1. Схема, отображающая разрешение светового оптического микроскопа.

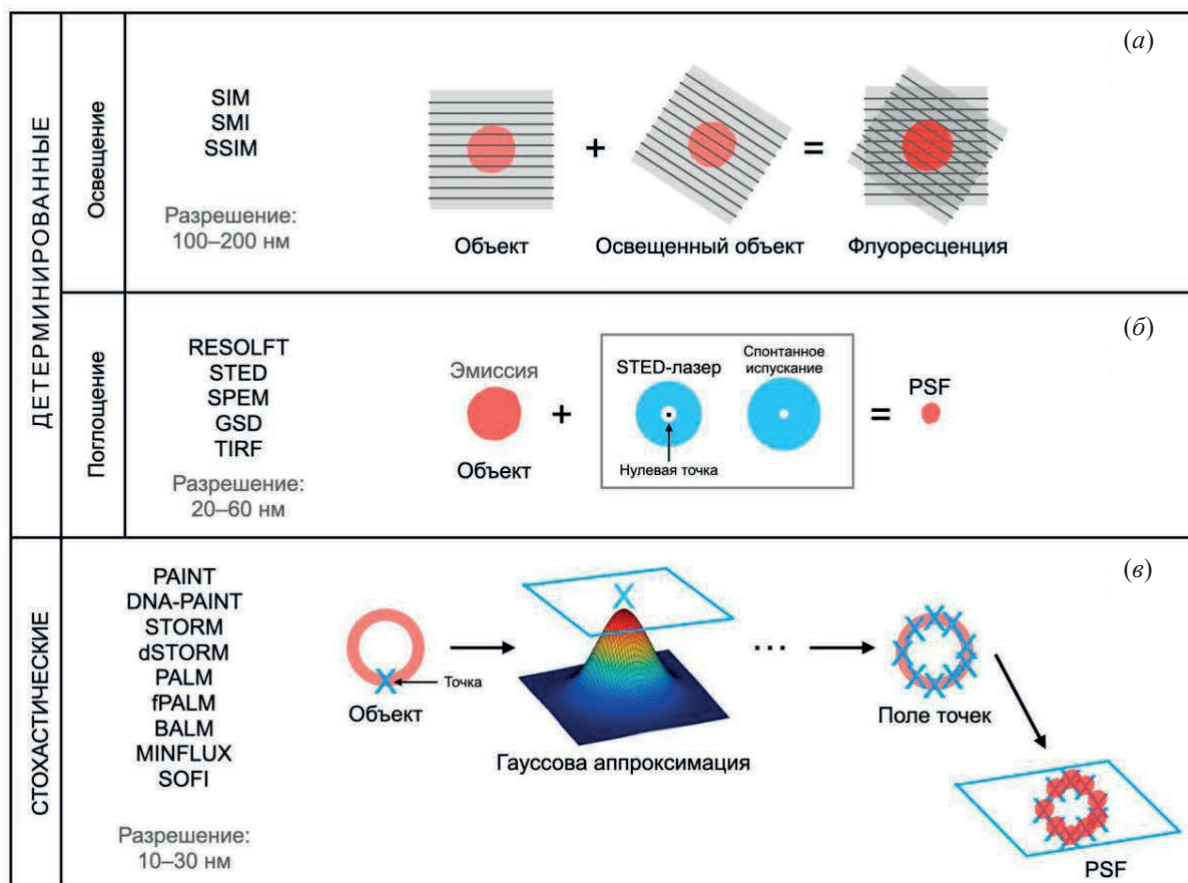


Рис. 2. Классификация методов микроскопии сверхвысокого разрешения. (a), (б) – Детерминированные методы, в основе которых лежит информация о пространственном распределении: (a) – заложенном в паттерн освещения (последовательное освещение образца стоячей волной): SIM (Structured Illumination Microscopy), SMI (Spatially Modulated Illumination Microscopy), SSIM (Saturated Structured Illumination Microscopy); (б) – о размере области, испускающей свет (отклик флуорофора на возбуждение света, которое стимулирует испускание): RESOLFT (REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions), STED (Stimulated Emission Depletion Microscopy), SPEM (Scanning PhotoElectron Microscope), GSD (Ground State Depletion Microscopy), TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence); (в) – стохастические методы, в основе которых лежит возможность локализации одиночных молекул практически с любой точностью, которая определяется числом зарегистрированных фотонов: PAINT (Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography), DNA-PAINT (DNA Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography), STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy), dSTORM (Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy), PALM (Photo-activated Localization Microscopy), fPALM (DNA structure fluctuation-assisted BALM), BALM (Binding-Activated Localization Microscopy), MINFLUX (Minimal Photon Fluxes), SOFI (Super-resolution Optical Fluctuation Imaging).

Далее в обзоре рассмотрены некоторые наиболее широко распространенные методы наноскопии, а также представлены наиболее современные работы с их применением.

2. МЕТОДЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ НАНОСКОПИИ STED

Микроскопия на основе подавления спонтанного испускания позволяет получать флуорес-

центные изображения в дальнем поле с неограниченным дифракционным разрешением [10]. Технически метод довольно сложен, впервые он был описан в 1994 г. [11, 12]. В STED-микроскопии возбуждение флуорофоров производится двумя пространственно наложенными друг на друга лазерными пучками. Обычный (имеющий Гауссов профиль) пучок возбуждает флуоресценцию молекул, а сверххрещение достигается путем ослаб-

ления возбуждения периферийных флуоресцентных молекул с помощью светового пучка, имеющего фокальное пятно в форме тора и смещенного по частоте в красную область спектра по сравнению с возбуждающим пучком – так называемый истощающий STED-пучок. STED-пучок перекрывает ограниченное дифракцией фокусное пятно возбуждения, и флуоресцентный сигнал излучается только из полой центральной области пучка STED, которая меньше, чем ограниченное дифракцией фокусное пятно возбуждающего пучка, что позволяет преодолеть дифракционный предел. Увеличение интенсивности пучка STED уменьшает эффективную функцию рассеяния точки (PSF) до размера, который в принципе не ограничен дифракцией. Однако стоит учитывать зависимость разрешения от интенсивности флуоресценции в центре пучка STED, т.е. если интенсивность флуоресценции изначально мала, то и ее величина в центре пучка будет также незначительна. Увеличивая интенсивность пучка STED, диаметр эффективных пятен ограничивается латеральным разрешением 20–70 нм. Аксиальное разрешение достигает 40–150 нм. Также необходимо использовать подходящие красители и адаптивное освещение, чтобы избежать фотообесцвечивания. Кроме того, системные и вызванные образом аберрации пучка STED могут значительно снизить качество луча и создать незначительную минимальную интенсивность.

Безусловно, метод STED совмещается с другими методами микроскопии, например, с TIRF, SIM, PAINT, которые рассмотрены ниже. Кроме того, STED может быть совместим технологиями получения 3D-изображений посредством ультрамикротомии с интегрированными оптическими системами, как, например, уникальная научная установка “Система зондово-оптической 3D корреляционной микроскопии” (<https://ckp-rf.ru/usu/486825/>) [13].

Исходная конфигурация STED-пучка обеспечивает повышение разрешения только в латеральном направлении. Для достижения трехмерного субдифракционного разрешения необходимо создать трехмерную точку “нулевой” интенсивности, окруженную областями с высокой интенсивностью STED по всем направлениям. В

качестве примера решения такой задачи можно привести работу Heine et al. [14], в которой использовали два наложенных друг на друга STED-пучка. Один из этих пучков образует фокус в форме тора и ограничивает флуоресценцию в латеральном направлении, а другой создает пустую зону в области перетяжки фокуса и ограничивает флуоресценцию в аксиальном направлении. Такое решение наиболее практичное и простое.

Среди методов сверхразрешающей микроскопии (STORM, PALM, RESOLFT) STED-микроскопия эффективно применяется для визуализации *in vivo*, главным образом благодаря возможности трехмерного секционирования, что является идеальным подходом для микроскопии тканей при использовании стандартных флуоресцентных белков [15]. Прорывным применением STED-микроскопии стало исследование дендритных и аксональных структур мозга живой мыши [16–19]. В 2018 г. удалось получить изображения наномасштабного распределения каркасного белка PSD95 на постсинаптической мембране возбуждающих синапсов в зрительной коре у живых мышей [17]. Изображения отличались высоким контрастом и низкой фоновой засветкой, а латеральное разрешение составило ~70 нм на глубине ≤ 25 мкм. В обзоре Calovi et al. (2021) [20] описаны технические преимущества STED-микроскопии для визуализации живых тканей головного мозга, а также освещены ключевые нейробиологические результаты, полученные с помощью этого метода.

Одно из применений микроскопии 3D-STED – изучение синаптической функции и пластичности [8]. Например, Katsube et al. [21] использовали для количественной оценки числа возбуждающих синапсов у мышей с синдромом Кауфмана в зонах CA1 и CA2 гиппокампа.

Другое применение – изучение локализации и динамики белков внутри клеток. Так, в 2023 г. была опубликована работа по количественному анализу белковых маркеров литических гранул иммунологических синапсов с помощью визуализации тау-STED и 3D-количественной солокализации маркеров литических гранул [22]. С использованием 3D STED исследуют механизмы липид-

ного обмена в реальном времени. Carravilla et al. [23] выполнили количественную оценку биофизических параметров мембраны с высоким временным и пространственным разрешением, длительным временем сбора данных. В частности, на живых клетках показаны процессы образования пузырьков и липидного обмена во время слияния мембран, а также благодаря корреляционной спектроскопии выполнена одновременная количественная оценка мембранной динамики и упаковки липидов.

STED применяется и для получения объемных изображений целых клеток. Например, Spahn et al. [24] исследовали живые бактериальные (*Escherichia coli*) и эукариотические клетки с использованием флуорогенных меток, которые обратимо связываются со структурой-мишенью. Такую концепцию обратимого связывания флуорофоров используют в микроскопии локализации одиночных молекул (SMLM) [25], а изначально она была реализована в накоплении точек для визуализации в наноразмерной топографии (PAINT). Постоянный обмен метками гарантирует удаление фотообесцвеченных флуорофоров и их замену интактными флуорофорами, тем самым обходя ограничения, связанные с обесцвечиванием изображений сверхвысокого

разрешения STED. Эта концепция отличается от традиционных для STED подходов, которые уменьшают фотообесцвечивание постоянно связанных меток за счет заполнения дополнительных молекулярных состояний.

Так, Spahn et al. [24] с помощью сменных меток удалось достичь высокой плотности маркировки, избежать обесцвечивания флуорофоров и обеспечить многоцветную 3D STED-визуализацию живых клеток (рис. 3).

3. RESOLFT

Микроскопия RESOLFT – тип микроскопии сверхвысокого разрешения, в которой используется обратимое фотопереключение флуоресцентных молекул [26–28]. Метод RESOLFT – усовершенствование концепции STED, поскольку он может дать разрешение, подобное STED, при низкой интенсивности истощающего луча. Так, латеральное разрешение RESOLFT достигает 40–80 нм, а аксиальное – 70–90 нм.

В микроскопии RESOLFT образец метят специфическими фотопереключаемыми флуоресцентными красителями, которые могут переключаться между ярким и темным состояниями. Лазерный луч с фокальным пятном в форме

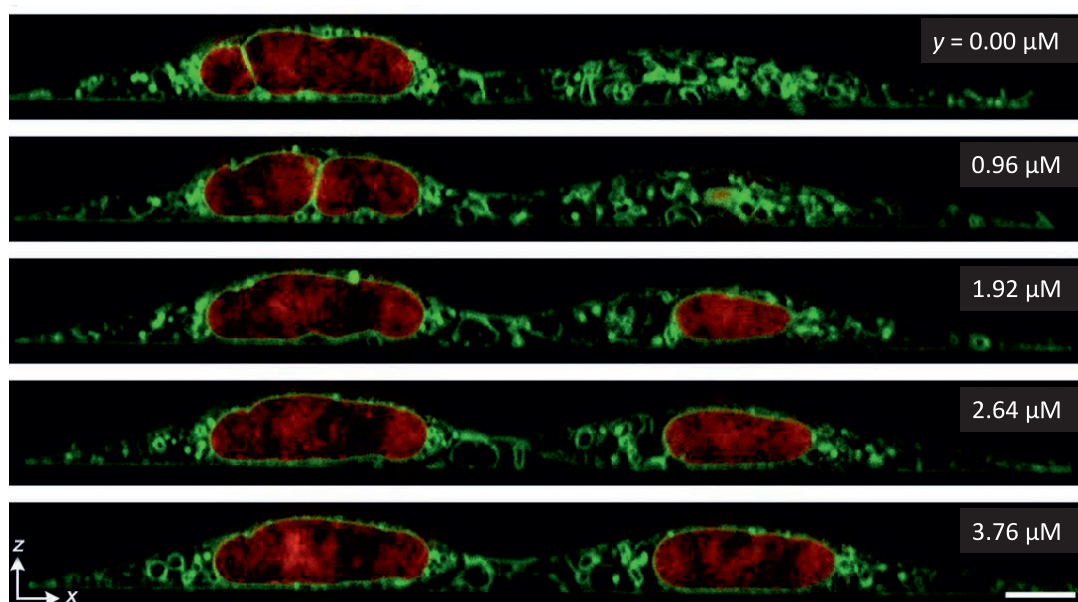


Рис. 3. 3D-STED-визуализация фиксированных клеток HeLa с флуоресцентно мечеными мембранами (зеленый) и ДНК (красный), с достижением почти изотропного разрешения, масштабный отрезок 5 мкм [24].

тора используется для перевода флуоресцентных молекул в темное состояние. Затем второй лазерный луч используется для возбуждения молекул в этой темной области и переключения их обратно в яркое состояние. Тщательно контролируя интенсивность и положение этих двух лазерных лучей, можно контролировать размер яркого пятна и уменьшать его до уровня ниже дифракционного предела света.

RESOLFT имеет преимущества перед STED-микроскопией с точки зрения уменьшения фотообесцвечивания и фотоповреждения образца, поскольку для получения истощения используется пучок низкой интенсивности. Кроме того, микроскопия STED может быть модифицирована до установки RESOLFT с использованием модуляционного луча вместо STED-луча.

Улучшение разрешения в RESOLFT, как и в STED, достигается различными способами: использованием разных оптических схем [29, 30], применением различных типов красителей. Например, используются так называемые диады, состоящие из фотохромного переключателя, ковалентно связанного с флуоресцентным красителем, которые позволяют контролировать излучение красителя за счет обратимой фотоизомеризации переключателя [31, 32]. Благодаря такой диаде Damenti et al. [32] получили 2D- и 3D-изображения тонкой трубчатой организации эндоплазматического ретикулума (ЭПР) аксонов, а максимальное пространственное разрешение составило 50 нм. Результаты показали сложную трубчатую сеть ЭПР вдоль нейритов с размером некоторых канальцев 60 нм. Авторы сделали следующие выводы: 1) сложность сети ЭПР с точки зрения количества канальцев, соединений и длины ветвей канальцев связана с размером ширины нейритов, а не с конкретной функцией компартмента; 2) трубчатая трехмерная геометрия нейронных ветвей влияет на пространственную организацию сети ЭПР для обеспечения и оптимизации распределения ресурсов.

Применение RESOLFT широко распространено, как и STED, особенно в областях клеточной биологии, нейробиологии и структурной биологии [33–35].

4. STORM

В отличие от STED-микроскопии, в STORM [36], PALM [37] и PAINT отдельные флуоресцентные молекулы считываются из случайных координат. При освещении широким полем включается или активируется отдельная молекула. Следующая активированная молекула находится на расстоянии $\lambda/2\eta$ (где λ – длина волны света, η – показатель преломления) от предыдущей активированной молекулы. Повторное возбуждение молекул формирует увеличенное дифракционное пятно на камере. Затем изображение собирается молекула за молекулой по механизму темного-яркого-темного состояния как для переключаемых, так и для не переключаемых флуорофоров. Обнаруженные фотоны позволяют локализовать положение центра пятна и определить латеральное положение молекул (рис. 4).

Следует отметить, что для получения высококачественных изображений STORM требуются флуорофоры с высоким выходом фотонов на одно событие переключения, высокой фотостабильностью и несколькими циклами переключения. Среди этих свойств низкий рабочий цикл включения-выключения приводит к максимальной плотности флуорофоров, что способствует достижению максимального разрешения изображения. Подбор флуорофоров – одна из главных задач для данного типа микроскопии, т.к. от них, по большей мере, и зависит разрешение изображений. Так, в обзорах [38, 39] описаны необходимые свойства существующих флуорофоров и даны рекомендации по использованию флуоресцентных зондов в микроскопии локализации одиночных молекул.

В статье 2008 г. Huang et al. [40] описан метод 3D-STORM, основанный на определении точного положения отдельных флуорофоров с помощью анализа астигматизма оптических изображений, возникающего за счет введения цилиндрической линзы в оптический тракт микроскопа. Таким образом, PSF по X и по Y будет иметь разную эллиптичность при разных Z . Иными словами, фокальные плоскости для X и Y будут отличаться. Коррелируя зависимости эллиптичности по Z для направлений X и Y , определяют глубину

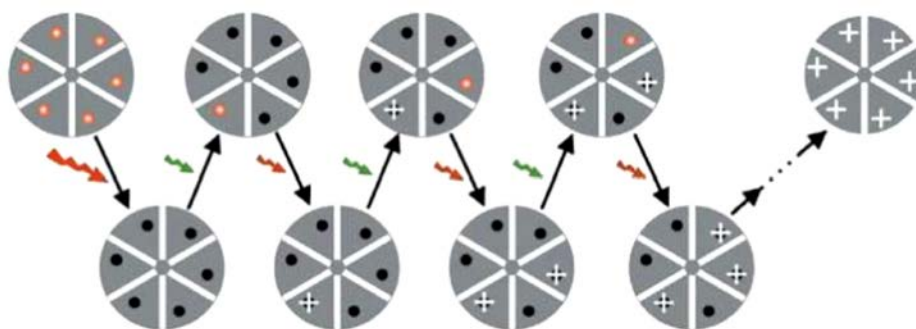


Рис. 4. Последовательность изображений STORM с использованием гипотетического гексамерного объекта, меченного красными флуорофорами, которые можно переключать между флуоресцентным и темным состоянием с помощью красного и зеленого лазеров. Все флуорофоры сначала переводятся в темное состояние импульсом красного лазера. В каждом цикле визуализации зеленый лазерный импульс используется для включения только части флуорофоров, образуя оптически разрешимый набор активных флуорофоров. Далее при красном освещении эти молекулы излучают флуоресценцию до тех пор, пока не выключатся, что позволяет с высокой точностью определить их положение (белые крестики). Затем общее изображение восстанавливается на основе положений флуорофора, полученных в результате нескольких циклов визуализации [36].

залегания флуорофора. С использованием данного подхода удалось достичь разрешения изображения в размере 20–30 нм в латеральном измерении и 50–60 нм в аксиальном измерении. В работе Albrecht et al. [41] представлен метод быстрой визуализации тканей на наноуровне (Rapid Imaging of Tissues at the Nanoscale, RAIN-STORM), улучшенный и масштабируемый подход к оптимизации наноскопических изображений, который улучшает 3D-визуализацию субклеточных мишеней в объеме ткани. По сути, RAIN-STORM – оптимизированная методика пробоподготовки и набор параметров для визуализации стандартных образцов тканей для широкого спектра молекулярных мишеней с использованием коммерчески доступных реагентов и систем визуализации. Также в статье Albrecht et al. [41] представлен избранный набор параметров 3D-визуализации тканей на основе разрешения, плотности маркировки антител и уменьшения фоновой флуоресценции. С помощью RAIN-STORM получены трехмерные наноскопические изображения для более чем 20 объектов, включая синапсы, нейроны, глию (рис. 5) и сосудистую сеть в сетчатке. Цикл измерений, начиная от подготовки образцов до получения изображений, занимает один день. Кроме того, метод можно применять к клиническим образцам для выявления

наноразмерных особенностей клеток и синапсов человека, что открывает путь для высокопроизводительных исследований наноскопических мишеней в тканях.

Микроскопия сверхвысокого разрешения 3D-STORM позволяет с наномасштабной точностью детектировать трехмерное пространственное положение флуорофоров. Так, Hu et al. [42] данным методом определили расположение зависимой от микротрубочек регуляции кластеров подосом, разрушающих матрикс, в макрофагах. Подосомы макрофагов – важная адгезионная архитектура на основе актина, они играют решающую роль в миграции клеток и инвазивности матрикса. Авторы определили ультраструктурную организацию кластеров подосом в первичных макрофагах, взаимную локализацию компонентов ядра и кольца подосомы, а также продемонстрировали, что микротрубочки проходят через подосомы в слой миозина (рис. 6). Пространственное разрешение достигло 20 и 50 нм в латеральном и аксиальном направлениях.

Наноскопию STORM применяют в сочетании с другими методиками, например, Kim et al. [43] предложили специфические протоколы подготовки образцов для STORM и методов электронной микроскопии (ЭМ). Данные протоколы реа-

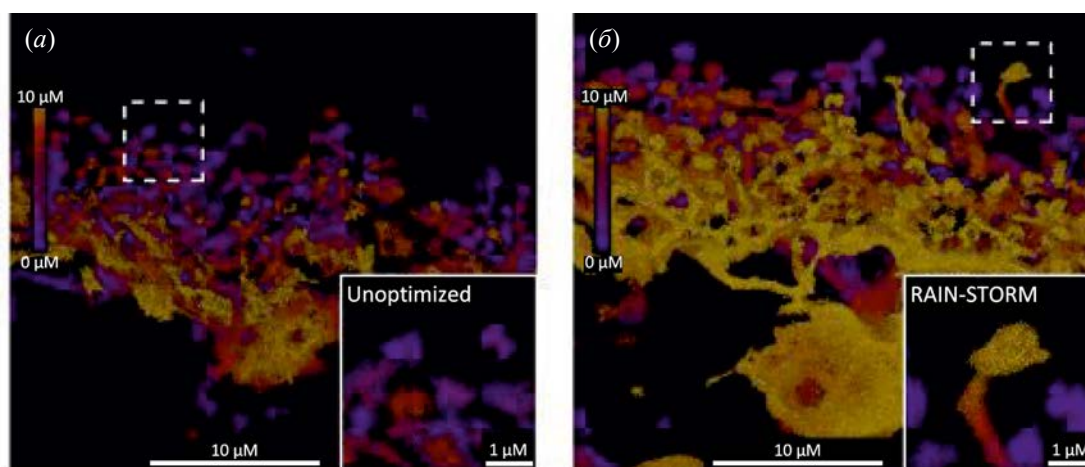


Рис. 5. (а) – Неоптимизированное изображение STORM горизонтальной клетки, меченной кальбиндином. Предполагаемые синапсы нечеткие, с малой определяющей морфологией или непрерывной структурой (неоптимизированная вставка); (б) – в оптимизированных условиях RAIN-STORM как горизонтальные синапсы клеток, так и их соединительные структуры помечены и расположены рядом (оптимизированная вставка), демонстрируя четкие структурные детали по всей ветви нейронов. Изображения репрезентативны от $n = 3$ животных. Изображения STORM имеют цветовую кодировку по глубине (от фиолетового – 0 мкм, до желтого – 10 мкм). Масштабные отрезки 10 и 1 мкм [41].

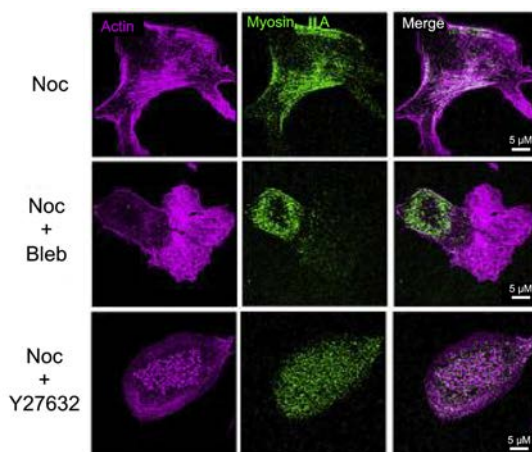


Рис. 6. Эффекты ингибирования передачи сигналов Rho/ROCK-миозина II A на нокодазол-индуцированную разборку кластеров подосом. Репрезентативные двухцветные результаты STORM актина и миозина II A в отдельных макрофагах, культивированных в течение 16 ч и затем обработанных Noc (10 мкМ), Noc (10 мкМ) + Y27632 (20 мкМ) и Noc (10 мкМ) + Bleb (20 мкМ) в течение 2 ч. Показаны отдельные изображения актина (фиолетовый) и миозина II A (зеленый), а также наложенное изображение соответственно [42].

лизуют возможности получения ЭМ-изображений после STORM-наноскопии образца, а также наоборот – для реализации STORM после ЭМ. В качестве образцов, демонстрирующих успешность применения методик, авторы выбрали микротрубочки и митохондрии клеток линии BS-C-1, а также филаменты вируса гриппа, отпочковавшиеся из инфицированных клеток.

5. PALM

PALM-микроскопия (photoactivation localization microscopy, микроскопия фотоактивируемой локализации) – это тип микроскопии сверхвысокого разрешения, который также основан на использовании флуоресцентных зондов – фотоактивируемых флуоресцентных белков, как и в

STORM, используются специфические органические красители. Впервые PALM была описана в 2006 г. [44], с помощью фотоактивируемого флуоресцирующего белка (Photoactivatable Fluorescent Protein, PAFP) авторы получили наномасштабное разрешение внутриклеточных белков, например, лизосомального трансмембранного белка CD63. Наряду с PALM, авторы также применяли TIRF-микроскопию и показали преимущество PALM в разрешении.

Простыми словами, принцип работы PAFP в PALM можно описать следующим образом. PAFP прикрепляются к интересующим молекулам или структурам, а затем образец освещается низкоинтенсивным лазером, чтобы активировать только небольшое подмножество PAFP. После активации PAFP излучают флуоресценцию, которую фиксирует камера. Затем активированные PAFP подвергаются фотообесцвечиванию, и, соответственно, больше не излучают флуоресценцию. Этот процесс повторяется несколько раз, при этом каждый раз активируются и визуализируются разные подмножества PAFP. Анализируя изображения активированных PAFP, локализацию каждой молекулы можно определить с высокой точностью. Затем эту информацию используют для восстановления изображения образца с высоким разрешением.

Однако, несмотря на преимущества сверхвысокого разрешения (10–50 нм в латеральном и 10–70 нм в аксиальном направлениях), PALM имеет существенное ограничение, т.к. в качестве меток используются только фотоактивируемые флуоресцентные белки (PA-FP), выборка которых на данный момент невелика.

Для получения 3D-изображений как в живых, так и в фиксированных препаратах используют метод iPALM (interferometric photoactivated localization microscopy, интерферометрическая фотоактивируемая локализационная микроскопия) [45]. Для получения iPALM в PALM интегрировали однофотонную многофазную интерферометрическую схему.

Несмотря на недостатки, PALM широко применяется для получения изображений различных внутриклеточных структур со сверхвысоким раз-

решением [46, 47], количественной оценки структурного созревания кардиомиоцитов, полученных из плюрипотентных стволовых клеток [48], характеристики белков вирионов вируса иммунодефицита человека [49, 50], визуализации фагоцитирующих подосом во время фрустрированного фагоцитоза [51], визуализации петель хроматина [52, 53].

6. PAINT

PAINT – тип стохастической наноскопии, основанный на накоплении точек для последующего получения изображений методом наномасштабной топографии (PAINT, points accumulation for imaging in nanoscale topography), это разновидность метода SMLM [54]. Латеральное разрешение достигает 25 нм [54]. Особенность этого метода – использование свободно диффундирующих красителей или меченных красителем лигандов, нацеленных на интересующие молекулы путем постоянного или временного связывания, тогда как в других методах применяется мечение целевых молекул фиксированными флуорофорами. В PAINT поток молекул, попадающих на объект, зависит от коэффициента диффузии и градиента концентрации зондов. Молекула локализуется с высокой точностью в каждом отдельном событии связывания, после чего может быть получена карта сверхвысокого разрешения на основе локализации всех индивидуальных молекул-зондов.

На основе PAINT был разработан еще один метод анализа одиночных молекул для изучения кинетики ДНК-оригами – DNA-PAINT [55, 56]. Метод использует обратимое специфическое связывание меченых олигонуклеотидов с наноструктурами ДНК для визуализации со сверхвысоким разрешением вплоть до 30 нм.

Метод DNA-PAINT – это метод микроскопии сверхвысокого разрешения, в котором короткие одноцепочечные молекулы ДНК используются в качестве зондов для локализации конкретных мишеней с высокой точностью. Временное связывание коротких меченных красителем олигонуклеотидов с их комплементарными целевыми нитями создает необходимое “мигание”, позволяющее проводить стохастическую микроскопию сверхвы-

сокого разрешения [55]. Короткие одноцепочечные молекулы ДНК, называемые “цепями визуализации” или формирователями изображения, способны комплементарно связываться с определенной последовательностью на молекуле-мишени и метятся флуоресцентным красителем. Второй набор молекул ДНК, называемый “стыковочными цепями”, имеет последовательность, комплементарную цепям формирователя изображения, и также связаны с флуоресцентным красителем. Связывание стыковочных нитей с нитями формирователя изображения приводит к сближению двух флуоресцентных красителей, что позволяет создать яркий и специфический сигнал. DNA-PAINT успешно применялся для визуализации структуры и динамики различных клеточных компонентов, а также для изучения организации хроматина и экспрессии генов в клетках, локализации белков, организации ДНК и сигнальных путей клеток [57, 58].

Также разрабатываются зонды PAINT, не зависящие от ДНК. Эти зонды могут быть основаны на эндогенных взаимодействиях, сконструированных связующих веществах, слитых белках или синтетических молекулах и обеспечивать дополнительные приложения для SMLM [59, 60]. Например, показанный Riera et al. [61] метод Glyco-PAINT использует слабое и обратимое связывание сахара для непосредственного обнаружения и количественного определения одиночных молекул в клетках. Применяется для установления коэффициента диффузии рецептор – сахарный комплекс.

Еще один вариант метода – pPAINT (Protein Point Accumulation in Nanoscale Topography, точечное накопление белка в наноразмерной топографии) [62]. pPAINT использует связывающие домены сигнальных белков в качестве функциональных зондов для сайтов связывания на плазматической мембране, перемещая мишень визуализации на сам белок. Farrell et al. [62] использовали pPAINT для исследования пространственно-временного распределения фосфотирозин-связывающих SH2-доменов различных сигнальных и адаптерных молекул в активированных Т-клетках на липидных бислоях.

В предложенном методе LIVE-PAINT (Live cell Imaging using reVersible intEractions PAINT) [63] за временные локализации, необходимые для SMLM, ответственны обратимые взаимодействия пептид–белок, а не связывание ДНК–олигонуклеотидов. Белок, который необходимо визуализировать, генетически слит с коротким пептидом и экспрессируется с помощью эндогенного промотора белка. Кроме того, интегрированный в подходящее место генома пептид-связывающий белок генетически слит с флуоресцентным белком и экспрессируется с помощью индуцируемого промотора, что позволяет контролировать и оптимизировать уровень его экспрессии.

7. MINFLUX

Одна из наиболее современных и совершенных методик MINFLUX (MINimal photon FLUXes) сочетает в себе принципы как стохастической микроскопии типа STORM/PALM, так и STED, и позволяет получать изображения биологических объектов с чрезвычайно высоким разрешением в трех измерениях [64, 65]. Для реализации методики MINFLUX используются два луча: луч для случайной фотоактивации одного из флуорофоров образца в зоне ~400 нм и возбуждающего луча, который локализует молекулы или отслеживает их перемещение. При этом осуществляется сканирование возбуждающим лучом, сформированным таким образом, что он имеет минимум интенсивности в фокусе. Этот минимум служит опорной координатой, при этом количество испускаемых фотонов уменьшается по мере приближения фокуса луча к флуорофору. Таким образом, если флуорофор расположен вблизи минимума интенсивности (центр фокуса возбуждающего пучка), он будет излучать лишь несколько фотонов флуоресценции, а любое небольшое смещение возбуждающего пучка приведет к увеличению числа испускаемых фотонов. Для непосредственной локализации флуорофора измерения проводят в четырех целевых точках, позволяющих определить локализацию флуорофора с точностью до 1 нм. Для выполнения 3D-измерений используется трехмерная кольцевая форма фокальной области возбуждающего луча с постепенно уменьшающимся диа-

метром. Аксиальное положение трехмерного минимума интенсивности контролируется с помощью электрически настраиваемой линзы, что позволяет перефокусироваться в диапазоне ~ 400 нм в течение 50 мкс. В целом указанный подход обеспечивает аксиальное разрешение порядка нескольких нанометров, а латеральное – до 1–3 нм в фиксированных и живых клетках [64, 66, 67] (рис. 7).

Развитие данного подхода – предложенный в 2023 г. интерферометрический микроскоп MINFLUX, который регистрирует движения белков с пространственно-временной точностью до 1.7 нм/мс [68, 69]. Такое прежде недостижимое

временное разрешение позволило изучить перемещение моторного белка кинезина-1 по микротрубочкам при физиологических концентрациях АТФ. Авторы обнаружили, что вращение ножки и головок кинезина без нагрузки происходит во время шагания, и показали, что АТФ захватывается одной головкой, связанной с микротрубочкой, а гидролиз АТФ происходит, когда связаны обе головки.

В 2022 г. Ostersehl et al. [70] использовали MINFLUX в сочетании с DNA-PAINT для получения изображений белковых комплексов в живых клетках со сверхвысоким разрешением. Они смогли визуализировать расположение белков,

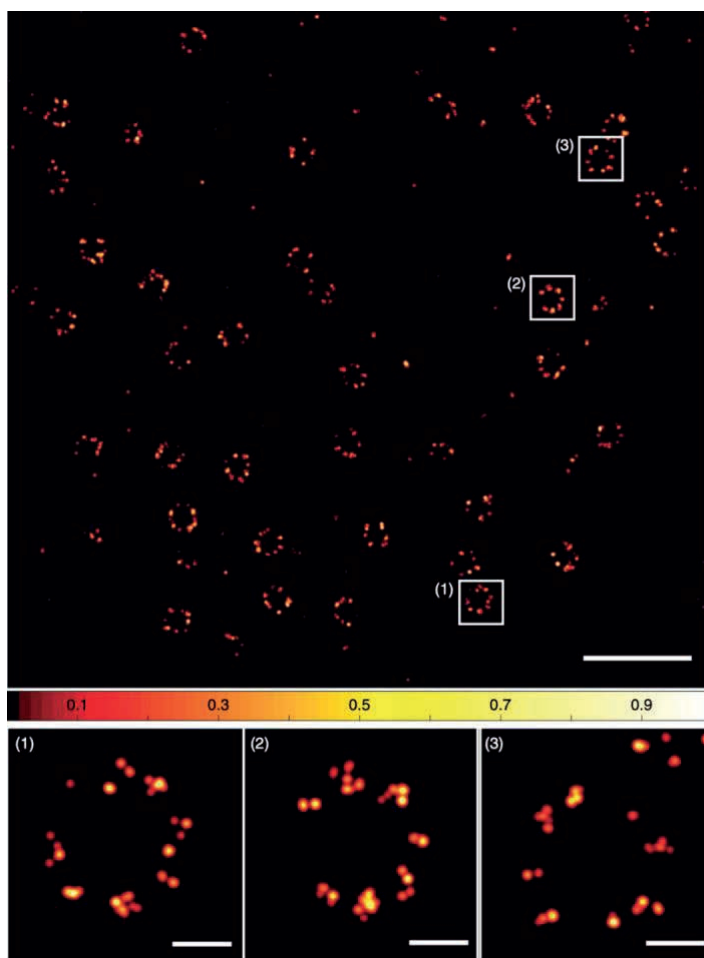


Рис. 7. Наноскопия MINFLUX клеток линии U-2 OS, экспрессирующих Nup96, белок комплекса ядерных пор (Nuclear Pore Complex, NPC), меченный органическим флуорофором Alexa Fluor 647 (сверху). Увеличенные фрагменты (ниже) показывают отдельные ядерные поры, где каждая точка выделяет группы локализаций, представляющих отдельные белки посредством их флуоресцентных меток. Масштабные отрезки: 500 нм (сверху), 50 нм (врезки) [64].

участвующих в репликации и восстановлении ДНК, что дало новое понимание этих фундаментальных клеточных процессов.

Недавняя работа Mulhall et al. [71] показала возможность применения MINFLUX для исследования механочувствительных ионных каналов PIEZO (Piezo Type Mechanosensitive Ion Channel Component, PIEZO), которые преобразуют силу в хемозлектрические сигналы и играют важную роль в различных физиологических условиях. PIEZO-каналы передают механическую силу посредством деформации обширных лопастей трансмембранных доменов, исходящих из центральной ионопроводящей поры. Благодаря наноскопии MINFLUX авторы показали, как эти каналы взаимодействуют с их естественной средой, и какие молекулярные движения лежат в основе активации.

В 2022 г. наноскопию MINFLUX впервые использовали для исследования бактерий и получения изображения бактериальной молекулярной машины (*Yersinia injectisome*) с точностью определения расположения белков и разрешением 5 нм [72].

Многоцветную 3D-наноскопию MINFLUX применили для визуализации плотно упакованных меченых белков – субъединиц комплекса MICOS (mitochondria contact site and cristae to outer membrane, место контакта митохондрий и крист с внешней мембраной), большого белкового комплекса внутри внутренней мембраны митохондрий, необходимого для структурной стабильности и организации крист. Pape et al. [73] продемонстрировали двухцветную 3D-наноскопию MINFLUX на митохондриях человека и показали, что данный тип наноскопии возможно использовать для визуализации субструктур органелл, обеспечивая точность 3D-локализации ~5 нм.

Подводя итог, можно с уверенностью сказать, что MINFLUX – передовой метод флуоресцентной наноскопии, который обеспечивает беспрецедентное пространственное разрешение, превосходит дифракционный предел и реализует детальное понимание молекулярных структур и динамики.

8. SIM

SIM использует периодически структурированное лазерное освещение для возбуждения флуоресценции образца. По сути, используется метод лазерной широкопольной микроскопии, где на пути луча возбуждения устанавливается подвижная дифракционная решетка [74], которая генерирует когерентные световые лучи, интерферирующие с образцом, что приводит к появлению эффекта муара, т.е. мультипликативного наложения двух периодических структур с отличными периодами с образованием высокочастотных пространственных паттернов. Одна из этих структур является пространственным распределением флуоресцентного красителя, а вторая – заведомо известной структурой освещения. В результате в наблюдаемой картине появляются муаровые полосы, связанные с интерференцией красителя и освещения. Получить искомую информацию возможно варьированием структуры освещения и сравнением результирующих структур. Разница между всеми результирующими структурами и будет содержать информацию об искомом распределении флуорофоров. Реконструкция получаемых изображений производится за счет обратного преобразования Фурье, что приводит к разделению пространственных частот и удвоению разрешения в трех измерениях. SIM обеспечивает разрешение в латеральной области 100–120 нм, а в аксиальной – до 300 нм. Разрешение восстановленного изображения излучающего объекта может быть улучшено как в латеральном, так и в аксиальном направлении при использовании суммы периодических схем освещения с разными фазами и ориентациями [75, 76]. Несмотря на изначально достаточное низкое разрешение, SIM нашла широкое применение благодаря тому, что не требует специфических флуорофоров, мощного лазерного возбуждения и имеет высокую скорость сканирования [74, 77]. На данный момент метод SIM – устаревшая методика из-за низкого разрешения, и в мире широко применяются различные вариации и комбинации SIM с другими методами сверхвысокого разрешения [78, 79],

такими как SIM-STORM [80], 3D SIM-STED [81, 82], TIRF-SIM [83, 84].

Одной из разработок, нашедших широкое применение, стала высокоскоростная многоцветная SIM (High Speed SIM, HS-SIM), функционирующая за счет применения волоконной SIM [85]. HS-SIM позволяет камере генерировать изображения с ограниченной частотой кадров и манипулировать ими в широком диапазоне длин волн. Схемы освещения генерируются путем объединения лазерных лучей в радиально противоположные пары волокон в шестиугольной одномодовой волоконной матрице, где выходные лучи передаются в заднюю фокальную плоскость объектива микроскопа. Фазовый переход и вращение диаграмм направленности контролируются быстродействующими электрооптическими устройствами, за счет чего скорость достигла 111 кадров SIM в секунду.

Один из распространенных и перспективных методов – микроскопия структурированного освещения со сверхразрешением (Super Resolution-Structured Illumination Microscopy, SR-SIM) [86]. SR-SIM использует периодическую интерференционную картину с периодичностью, близкой к пределу оптической дифракции. Также метод не требует специфического мечения, высокой энергии возбуждения и большого количества фотонов флуоресценции. По этим причинам данный вид микроскопии – один из наиболее универсально применяемых оптических методов со сверхразрешением для широкого спектра биологических задач.

Большой вклад в улучшение качества изображений и разрешения вносят постобработки с использованием различного программного обеспечения. Так, в работе Ward et al. [87] представлена интерферометрическая микроскопия со структурированным освещением с поддержкой машинного обучения (Machine Learning Assisted Interferometric Structured Illumination Microscopy, MAI-SIM). MAI-SIM позиционируется как простой в реализации метод визуализации живых клеток со сверхвысоким разрешением на высокой скорости и в нескольких цветах. Прибор основан на конструкции интерферометра, в которой

паттерны освещения генерируются, вращаются и синхронизируются по фазе за счет движения гальванозеркала. Конструкция работает в широком диапазоне длин волн. Кроме прибора в работе представлен набор инструментов машинного обучения с открытым исходным кодом, который позволяет выполнять реконструкции изображений в реальном времени, обеспечивая мгновенную визуализацию со сверхвысоким разрешением.

Применение SIM описано во множестве обзоров, посвященных методам микроскопии сверхвысокого разрешения в различных областях биологических наук [8, 77, 78, 88]. Далее мы приведем некоторые частные примеры применения методов, основанных на SIM.

Волоконная HS-SIM была использована для получения многоцветных изображений микротрубочек и митохондрий клеток линии COS7 с субдифракционным разрешением [85] (рис. 8).

В работе Hong et al. [89] описана 3D-визуализация синаптических структур с помощью SIM. Для разработки матрицы преобразования использовали субдифракционные многоцветные флуоресцентные сферы размером 100–200 нм, затем полученную матрицу применяли к SIM-изображению для выравнивания цветовых каналов. Дальнейшая постобработка изображений позволила визуализировать в объеме с высоким

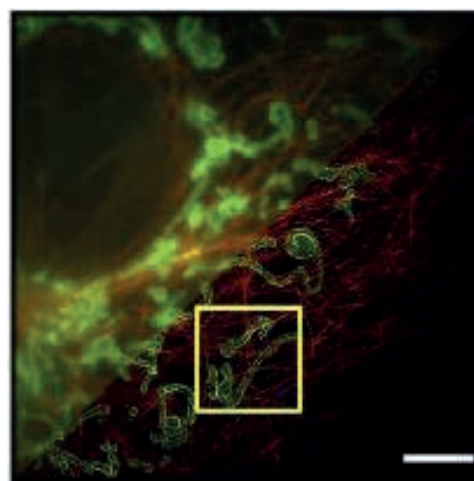


Рис. 8. Возможности многоцветной высокоскоростной SIM. Поле зрения 33×33 мкм, микротрубочки показаны красным, митохондрии – зеленым. Масштабный отрезок 5 мкм [85].

разрешением центры иммунореактивных пятен пресинаптического маркера синаптофизина и постсинаптического PSD-95, находящиеся в пределах 200 нм друг от друга.

3D-SIM использовали для обнаружения иммуногистохимических сигналов нервно-мышечных синапсов личинок дрозофилы с окрашенными пре- и постсинаптическими компонентами [90, 91]. Латеральное и аксиальное разрешение 3D-SIM составило ~100 и ~250 нм соответственно.

В работе Miao et al. [92] благодаря 2D- и 3D-SIM-визуализации (рис. 9) были выявлены места назначения белков рецептор-связывающего домена (RBD, receptor-binding domain) SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) и ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2, Angiotensin-converting enzyme 2), а также движение и созревание солокализованных везикул ACE2/RBD в живых клетках, движение везикул по микротрубочкам. В результате было показано, что инфицирующие вирусные RBD и, возможно, другие капсидные белки в конечном итоге захватываются и расщепляются лизосомами, даже если вирусная РНК стимулирует образование нового вируса.

9. RIM

Микроскопия со случайным освещением (Random Illumination Microscopy, RIM) преодолевает дифракционный барьер благодаря случайному спекл-освещению (Speckled Illumination), а построение изображений происходит за счет ста-

тистической реконструкции. По сравнению с классической SIM, метод RIM более устойчив к оптическим aberrациям и рассеянию, вносимым толстыми (сотни микрометров) образцами, линейен по яркости и совместим с многоцветной визуализацией, за счет чего считается более надежным методом визуализации живых клеток в течение длительных периодов времени. Впервые принцип RIM был предложен в 2012 г. [93]. Концепция RIM заключается в освещении образца несколькими неконтролируемыми спеклами и извлечении изображения со сверхразрешением из множества полученных изображений с низкими пространственными частотами. При этом разрешение метода оставалось слишком низким для визуализации субклеточной динамики, и в 2021 г. был предложен собственно метод RIM, основанный на спекл-освещении, который обеспечивает уровень сверхразрешения, сопоставимый с 3D SIM [94]. В 2022 г. опубликован [95] алгоритм реконструкции для флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения, основанный на спекл-освещении и дисперсионном сопоставлении изображений – algoRIM. Алгоритм обеспечивает сверхразрешение с коэффициентом два с точки зрения количества изображений и соотношения сигнал/шум. Кроме того, предложен подход увеличения разрешения RIM за счет учета корреляции испускаемых фотонов [96].

На сегодняшний день метод RIM не популярен, но, исходя из его достоинств, он, вероятно, получит широкое распространение. Уже в 2023 г.

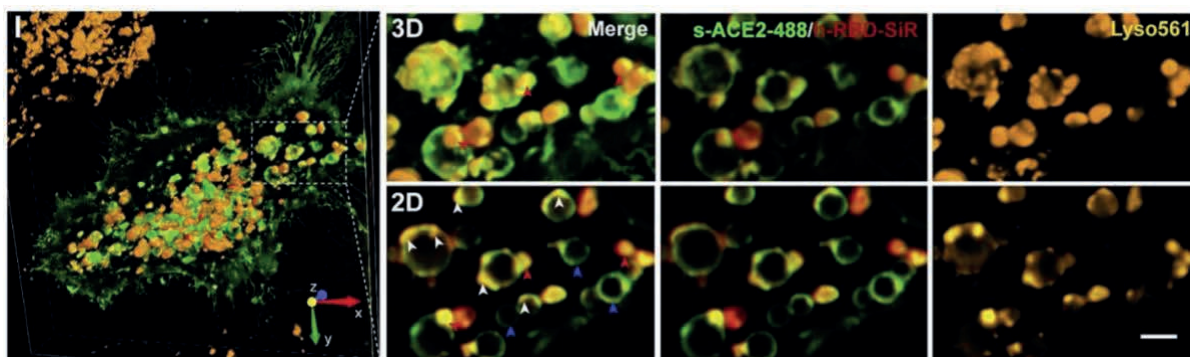


Рис. 9. 3D-SIM и увеличенное 2D/3D-изображение живых клеток HeLa, инкубированных с 25 нМ h-RBD-SiR в течение 10 ч. Масштабный отрезок 2 мкм [92].

была опубликована статья о комбинированном методе TIRF-RIM [97]. В TIRF-RIM образец освещается в условиях TIRF, но с добавлением случайно генерируемых спеклов. Эти спеклы создаются путем пропускания света освещения через рассеиватель или использования пространственных модуляторов света. В процессе измерений происходит регистрация нескольких изображений образца и восстановление изображения со сверхразрешением на основе их дисперсии. Оказалось, что TIRF-RIM превосходит стандартную TIRF-микроскопию более чем вдвое в разрешении и гораздо высоком контрасте с минимальным размытием вне фокуса. TIRF-RIM обеспечила разрешение кольцевой формы покрытых клатрином ямок (специализированные участки на плазматической мембране, которые концентрируют рецепторы) фиксированных клеток линии COS-7 и позволила получить изображение базальной поверхности фиксированных макрофагов с разрешением 86 нм. Также с использованием TIRF-RIM было получено двухцветное динамическое изображение нанокластеров паксиллина с пространственным (96–120 нм) и временным (1–8 Гц) разрешением.

10. TIRF

TIRF позволяет визуализировать флуоресцентные молекулы, расположенные вблизи границы раздела сред с существенным различием показателей преломления, таких как стекло/вода или стекло/образец [98, 99]. Высокое аксиальное разрешение достигается за счет возбуждения затухающей (эванесцентной) волны, которая, в свою очередь, возбуждает флуорофоры вместо прямого освещения. Эванесцентное поле возникает в тот момент, когда падающий свет полностью отражается на границе раздела двух прозрачных сред с разными показателями преломления. В биологических приложениях границей раздела, как правило, является покровное стекло и слой водного раствора между покровным стеклом и прикрепленными клетками. Возбуждающий свет проходит через стеклянную подложку к водному образцу под достаточно малым углом, так что происходит полное внутреннее отражение из-за уменьшения показателя преломления на

границе раздела стекло/вода. Поскольку энергия эванесцентного поля экспоненциально убывает с расстоянием до границы раздела, возбуждаются только флуорофоры, находящиеся в непосредственной близости к покровному стеклу. Это эффективно исключает фоновую флуоресценцию из основной массы образца и, тем самым, способствует достижению достаточно высокого отношения сигнал/шум для обнаружения одиночных молекул в широком поле зрения. Кроме того, микроскопия TIRF позволяет получать изображения с исключительно высоким аксиальным разрешением (< 100 нм) [100]. Это позволяет наблюдать мембраносвязанные процессы, такие как клеточная адгезия, связывание гормонов, транспорт молекул, а также процессы экзоцитоза и эндоцитоза (например, высвобождение и поглощение нейромедиаторов) [101]. Однако латеральное разрешение TIRF по-прежнему ограничено дифракционным пределом и составляет ~ 200 – 300 нм. Распространяющиеся (не эванесцентные) волны, возникающие из-за несовершенства оптики или из-за рассеяния света самим образцом, возбуждают флуоресцентные маркеры в объеме образца, что приводит к расфокусированной флуоресценции, отрицательно влияющей на контрастность изображения.

TIRF также сочетают с другими методами наноскопии с целью увеличения соотношения сигнал/шум [102]. Так, Fan et al. [103] предложили метод повышения точности аксиальной локализации в SMLM путем объединения с методикой TIRF. Недавняя передовая работа в области 3D TIRF представила многоугловой TIRF (MA-TIRF, Multiangle Total Internal Reflection Fluorescence) [104], который основан на использовании различных углов засветки. Этот метод позволяет исследовать образцы на глубине до 400 нм с аксиальным разрешением 10–20 нм и латеральным разрешением, ограниченным дифракционным пределом. Сочетание MA-TIRF с микроскопией локализации одиночных молекул (SMLM) позволило картировать топографию клеточной мембраны. Была восстановлена средняя трехмерная топографическая карта поверхности Т-клеток и L-селектина на основе измерений с

тремя разными углами падения (65.5 , 66.8 и 68.6°) [105] (рис. 10).

Изображения TIRF были получены путем последовательной визуализации и фотообесцвечивания флуоресцентных молекул из нескольких слоев в пределах нормальной зоны возбуждения TIRF. Глубину затухающей волны на разных слоях изменяли путем настройки угла падения возбуждающего света. Реконструкция изображений TIRF позволила получить 3D-изображение биологических образцов с аксиальным разрешением 20 нм и максимальной глубиной 250 нм. В каждом оптическом “срезе” применяли SMLM, что обеспечило латеральное разрешение ~ 100 нм.

Также недавно был разработан фотометрический метод локализации одиночных флуоресцентных молекул с нанометровой точностью в аксиальном направлении TIRF-микроскопа [106] – микроскопия сверхкритического освещения и фотометрическая z -локализация с повышенным разрешением (SIMPLER, Supercritical Illumination Microscopy Photometric z -Localization with Enhanced Resolution). SIMPLER – фотометрический метод декодирования аксиального положения одиночных молекул во флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения [106]. SIMPLER не требует какой-либо аппаратной модификации обычного TIRF-микроскопа и дополняет любой метод 2D-микроскопии локализации одиночных молекул для получения 3D-изображений с почти

изотропным наномасштабным разрешением. SIMPLER позволяет определять аксиальное положение (z) одиночных молекул на основе учета трех параметров: z -зависимости интенсивности возбуждения, z -зависимости углового излучения и независимой от z латеральной функции рассеяния точки от одиночной молекулы. Также SIMPLER можно сочетать с DNA-PAINT и STORM, достигая точности аксиальной локализации < 10 и 20 нм соответственно во всем аксиальном диапазоне до 250 нм.

В микроскопии TIRF-SIM структурированное освещение ограничено плоскостью TIRF, являющейся границей раздела между стеклом и водной средой [84, 107]. Используя пространственный модулятор света, система TIRF-SIM может проецировать структурированное освещение образца со сдвигом по углу и фазе с достаточной скоростью для поддержки визуализации живых клеток. Это позволяет использовать более мягкое освещение SIM для получения изображений живых клеток с улучшенным разрешением. TIRF-SIM обеспечивает более высокое пространственное разрешение, чем стандартная 2D-SIM, и требует меньшего времени сбора данных, чем 3D-SIM, из-за ограничения до двух измерений.

Подобно традиционной флуоресцентной микроскопии, возможности TIRF-SIM ограничены случаем слабо флуоресцирующих и динамических образцов: длительное время сбора данных при-

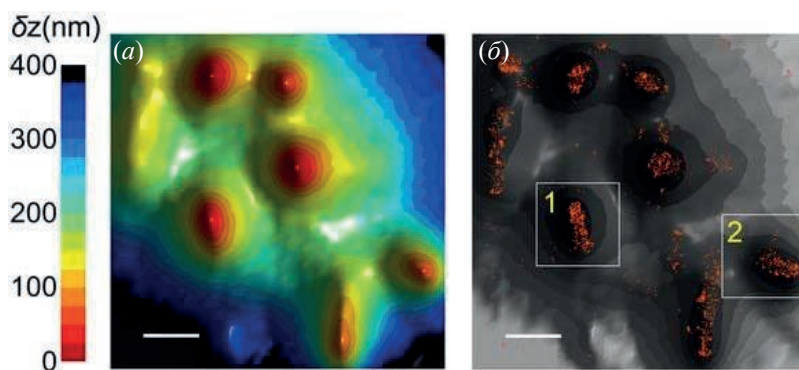


Рис. 10. Локализация L-селектина и CD44 на трехмерной топографии поверхности Т-клеток. (а) – Трехмерная реконструкция поверхности покоящейся мембраны Т-клеток человека с использованием МА-TIRFM; (б) – карта локализации молекул L-селектина (оранжевые точки), наложенная на карту реконструкции 3D-поверхности из панели (а). Масштабный отрезок 0.5 мкм [105].

водит к размытию движения, в то время как короткое время сбора данных приводит к получению изображений с низким соотношением сигнал/шум и ошибкам в процессе реконструкции. Для преодоления указанных недостатков Roth et al. [84] разработали систему TIRF-SIM с зеркалами с пьезосканированием и интерферометром Майкельсона для расщепления луча. Данная схема позволяет одновременно получать двухцветные изображения TIRF-SIM, тем самым сокращая время измерений. Также Roth et al. [84] продемонстрировали, что TIRF-SIM предлагает пространственное разрешение, близкое к 110 нм, с объективом $NA = 1.46$. Ключевое применение системы – отображение динамических белков, таких как MreB в бактериях и актина в эукариотических клетках, которые слабо флуоресцируют и обладают высокой динамикой.

В последнее время стала популярной и довольно многообещающей наноскопия на основе фотонных чипов (chip-TIRF) [108, 109]. Метод основан на использовании фотонного чипа, который используется как подложка для образца и, в то же время, обеспечивает возбуждающее освещение для флуоресценции. Обычно фотонный чип состоит из нескольких слоев: базовой кремниевой подложки, слоя диоксида кремния, биосовместимого основного слоя – волновода, пропускающего видимый свет и обеспечивающего полное внутреннее отражение, который состоит из нитрида кремния или пентаоксида тантала. Соответственно, на поверхности волновода возникает затухающее поле с дальностью освещения до ~150–200 нм, которое используется для возбуждения флуоресцентных маркеров, расположенных вблизи поверхности, а образцы размещаются непосредственно на поверхности волновода.

В работе Villegas-Hernández et al. [109] описаны протоколы окрашивания и параметры визуализации, необходимые для микроскопии образцов тканей на основе фотонных чипов, а также проблемы и преимущества, предлагаемые этой платформой визуализации для исследования срезов тканей. Кроме того, как утверждают авторы [109], их исследование микроскопии срезов тканей сверхвысокого разрешения на основе фотонных чипов является первым. Также впервые приведены

исследования плаценты человека и тканей почек человека со сверхвысоким разрешением с использованием методов оптической наноскопии, основанных на флуктуациях интенсивности.

11. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние десятилетия открытие принципов микроскопии сверхвысокого разрешения привело к разработке большого числа методов, которые способны выявлять особенности объектов на наноуровне. Флуоресцентная наноскопия открыла новое понимание многих внутриклеточных, молекулярных, сигнальных процессов, а также важных процессов формирования мембран, движения рецепторов и многих других. Нам представлялось важным показать ряд самых современных работ, использующих методы флуоресцентной наноскопии в различных областях биологии, и, таким образом, отразить широту применения и высокую скорость развития наноскопии.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-10071 (<https://rscf.ru/project/23-24-10071/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abbe E.* // Archiv für mikroskopische Anatomie. 1873. V. 9. P. 413–468.
<https://doi.org/10.1007/BF02956173>
2. *Minsky M.* // Scanning. 1988. V. 10. P. 128–138.
<https://doi.org/10.1002/sca.4950100403>
3. *Kaiser W., Garrett C.* // Phys. Rev. Lett. 1961. V. 7. P. 229–231.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.7.229>
4. *Hell S.W., Stelzer E.H.K., Lindek S., Cremer C.* // Opt. Lett. 1994. V. 19. P. 222–224.
<https://doi.org/10.1364/OL.19.000222>

5. *Bahlmann K., Jakobs S., Hell S.W.* // *Ultramicroscopy*. 2001. V. 87. P. 155–164.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(00\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(00)00092-9)
6. *Khater I.M., Nabi I.R., Hamarneh G.* // *Patterns*. 2020. V. 1. P. 100038.
<https://doi.org/10.1016/j.patter.2020.100038>
7. *Gong J., Jin Z., Chen H., He J., Zhang Y., Yang X.* // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2023. V. 196. P. 114791.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114791>
8. *Werner C., Sauer M., Geis C.* // *Chem. Rev.* 2021. V. 121. P. 11971–12015.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01174>
9. *Jacquemet G., Carisey A.F., Hamidi H., Henriques R., Leterrier C.* // *J. Cell Sci.* 2020. V. 133. P. jcs240713.
<https://doi.org/10.1242/jcs.240713>
10. *Vicidomini G., Bianchini P., Diaspro A.* // *Nat. Methods*. 2018. V. 15. P. 173–182.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4593>
11. *Hell S.W., Wichmann J.* // *Opt. Lett.* 1994. V. 19. P. 780–782.
<https://doi.org/10.1364/ol.19.000780>
12. *Hell S.W., Kroug M.* // *Appl. Phys. B*. 1995. V. 60. P. 495–497.
<https://doi.org/10.1007/BF01081333>
13. *Mochalov K.E., Chistyakov A.A., Solovyeva D.O., Mezin A.V., Oleinikov V.A., Vaskan I.S., Molinari M., Agapov I.I., Nabiev I., Efimov A.E.* // *Ultramicroscopy*. 2017. V. 182. P. 118–123.
<https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2017.06.022>
14. *Heine J., Wurm C.A., Keller-Findeisen J., Schönle A., Harke B., Reuss M., Winter F.R., Donnert G.* // *Rev. Sci. Instrum.* 2018. V. 89. P. 053701.
<https://doi.org/10.1063/1.5020249>
15. *Blom H., Widengren J.* // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2014. V. 20. P. 127–133.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.06.004>
16. *Berning S., Willig K.I., Steffens H., Dibaj P., Hell S.W.* // *Science*. 2012. V. 335. P. 551–552.
<https://doi.org/10.1126/science.1215369>
17. *Masch J.-M., Steffens H., Fischer J., Engelhardt J., Hubrich J., Keller-Findeisen J., D'Este E., Urban N.T., Grant S.G.N., Sahl S.J., Kamin D., Hell S.W.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. P. E8047–E8056.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1807104115>
18. *Pfeiffer T., Poll S., Bancelin S., Angibaud J., Inavalli V.K., Keppler K., Mittag M., Fuhrmann M., Nägerl U.V.* // *Elife*. 2018. V. 7. P. 1–17.
<https://doi.org/10.7554/eLife.34700>
19. *Steffens H., Wegner W., Willig K.I.* // *Methods*. 2020. V. 174. P. 42–48.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.05.020>
20. *Calovi S., Soria F.N., Tønnesen J.* // *Neurobiol. Dis.* 2021. V. 156. P. 105420.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105420>
21. *Katsube S., Koganezawa N., Hanamura K., Cuthill K.J., Tarabykin V., Ambrozkiwicz M.C., Kawabe H.* // *Neurosci. Lett.* 2023. V. 797. P. 137059.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137059>
22. *Scharrig E., Sanmillan M.L., Giraudo C.G.* // *Methods Cell Biol.* 2023.
<https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2023.01.018>
23. *Carravilla P., Dasgupta A., Zhurgenbayeva G., Danylchuk D.I., Klymchenko A.S., Sezgin E., Eggeling C.* // *Biophys. Rep.* 2021. V. 1. P. 100023.
<https://doi.org/10.1016/j.bpr.2021.100023>
24. *Spahn C., Grimm J.B., Lavis L.D., Lampe M., Heilemann M.* // *Nano Lett.* 2019. V. 19. P. 500–505.
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b04385>
25. *Sauer M., Heilemann M.* // *Chem. Rev.* 2017. V. 117. P. 7478–7509.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00667>
26. *Keller J., Schönle A., Hell S.W.* // *Opt. Express*. 2007. V. 15. P. 3361–3371.
<https://doi.org/10.1364/oe.15.003361>
27. *Rittweger E., Rankin B.R., Westphal V., Hell S.W.* // *Chem. Phys. Lett.* 2007. V. 442. P. 483–487.
<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2007.06.017>
28. *Sharma R., Singh M., Sharma R.* // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2020. V. 231. P. 117715.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117715>
29. *Zhang P., Goodwin P.M., Werner J.H.* // *Opt. Express*. 2014. V. 22. P. 12398–12409.
<https://doi.org/10.1364/OE.22.012398>
30. *Yu W., Ji Z., Dong D., Yang X., Xiao Y., Gong Q., Xi P., Shi K.* // *Laser Photonics Rev.* 2016. V. 10. P. 147–152.
<https://doi.org/10.1002/lpor.201500151>
31. *Frawley A.T., Wycisk V., Xiong Y., Galiani S., Sezgin E., Urbančič I., Jentsch A.V., Leslie K.G., Eggeling C., Anderson H.L.* // *Chem. Sci.* 2020. V. 11. P. 8955–8960.
<https://doi.org/10.1039/D0SC02447C>
32. *Damenti M., Coceano G., Pennacchietti F., Bodén A., Testa I.* // *Neurobiol. Dis.* 2021. V. 155. P. 105361.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105361>

33. *Sahl, S.J., Hell, S.W.* // In: High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology / Eds. Bille J. Cham: Springer, 2019. P. 3–32.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-16638-0_1
34. *Boden A., Pennacchietti F., Coceano G., Damenti M., Ratz M., Testa I.* // Nat. Biotechnol. 2021. V. 39. P. 609–618.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-00779-2>
35. *Willig K.I.* // iScience. 2022. V. 25. P. 104961.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104961>
36. *Rust M.J., Bates M., Zhuang X.W.* // Nat. Methods. 2006. V. 3. P. 793–795.
<https://doi.org/10.1038/nmeth929>
37. *Hess S.T., Girirajan T.P.K., Mason M.D.* // Biophys. J. 2006. V. 91. P. 4258–4272.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091116>
38. *Kikuchi K., Adair L.D., Lin J., New E.J., Kaur A.* // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2023. V. 62. P. e202204745.
<https://doi.org/10.1002/anie.202204745>
39. *Li H., Vaughan J.C.* // Chem. Rev. 2018. V. 118. P. 9412–9454.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00767>
40. *Huang B., Wang W., Bates M., Zhuang X.* // Science. 2008. V. 319. P. 810–813.
<https://doi.org/10.1126/science.1153529>
41. *Albrecht N.E., Jiang D., Akhanov V., Hobson R., Speer C.M., Robichaux M.A., Samuel M.A.* // Cell Rep. Methods. 2022. V. 2. P. 100253.
<https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2022.100253>
42. *Hu F., Zhu D., Dong H., Zhang P., Xing F., Li W., Yan R., Zhou J., Xu K., Pan L., Xu J.* // iScience. 2022. V. 25. P. 105514.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105514>
43. *Kim D., Deerinck T.J., Sigal Y.M., Babcock H.P., Ellisman M.H., Zhuang X.* // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0124581.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124581>
44. *Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lippincott-Schwartz J., Hess H.F.* // Science. 2006. V. 313. P. 1642–1645.
<https://doi.org/10.1126/science.1127344>
45. *Shtengel G., Galbraith J.A., Galbraith C.G., Lippincott-Schwartz J., Gillette J.M., Manley S., Sougrat R., Waterman C.M., Kanchanawong P., Davidson M.W., Fetter R.D., Hess H.F.* // PNAS. 2009. V. 106. P. 3125–3130.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0813131106>
46. *Shtengel G., Wang Y., Zhang Z., Goh W.I., Hess H.F., Kanchanawong P.* // Methods Cell Biol. 2014. V. 123. P. 273–294.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420138-5.00015-X>
47. *Baddeley D., Bewersdorf J.* // Annu. Rev. Biochem. 2018. V. 87. P. 965–989.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014801>
48. *Lemcke H., Skorska A., Lang C.I., Johann L., David R.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 2819.
<https://doi.org/10.3390/ijms21082819>
49. *Saha I., Saffarian S.* // Biophys. J. 2020. V. 119. P. 581–592.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.06.023>
50. *Chojnacki J., Eggeling C.* // Retrovirology. 2018. V. 15. P. 41.
<https://doi.org/10.1186/s12977-018-0424-3>
51. *Herron J.C., Hu S., Watanabe T., Nogueira A.T., Liu B., Kern M.E., Aaron J., Taylor A., Pablo M., Chew T.L., Elston T.C., Hahn K.M.* // Nat. Commun. 2022. V. 13. P. 4363.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-32038-0>
52. *Parteka-Tojek Z., Zhu J.J., Lee B., Jodkowska K., Wang P., Aaron J., Chew T.L., Banecki K., Plewczynski D., Ruan Y.* // Sci. Rep. 2022. V. 12. P. 8582.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-12568-9>
53. *Trzaskoma P., Ruszczycki B., Lee B., Pels K.K., Krawczyk K., Bokota G., Szczepankiewicz A.A., Aaron J., Walczak A., Śliwińska M.A., Magalska A., Kadlof M., Wolny A., Parteka Z., Arabasz S., Kiss-Arabasz M., Plewczynski D., Ruan Y., Wilczyński G.M.* // Nat. Commun. 2020. V. 11. P. 2120.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15987-2>
54. *Sharonov A., Hochstrasser R.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 18911–18916.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0609643104>
55. *Schnitzbauer J., Strauss M., Schlichthaerle T., Schueder F., Jungmann R.* // Nat. Protoc. 2017. V. 12. P. 1198–1228.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2017.024>
56. *Jungmann R., Avendano M.S., Woehrstein J.B., Dai M., Shih W.M., Yin P.* // Nat. Methods. 2014. V. 11. P. 313–318.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2835>
57. *Niederauer C., Nguyen C., Wang-Henderson M., Stein J., Strauss S., Cumberworth A., Stehr F., Jungmann R., Schwillle P., Ganzinger K.A.* // Nat. Commun. 2023. V. 14. P. 4345.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-40065-8>

58. Brockman J.M., Su H., Blanchard A.T., Duan Y., Meyer T., Quach M.E., Glazier R., Bazrafshan A., Bender R.L., Kellner A.V., Ogasawara H., Ma R., Schueder F., Petrich B.G., Jungmann R., Li R., Mattheyses A.L., Ke Y., Salaita K. // *Nat. Methods*. 2020. V. 17. P. 1018–1024.
<https://doi.org/10.1038/s41592-020-0929-2>
59. Tholen M.M.E., Tas R.P., Wang Y., Albertazzi L. // *Chem. Commun. (Camb)*. 2023. V. 59. P. 8332–8342.
<https://doi.org/10.1039/d3cc00757j>
60. Chang Y., Kim D.H., Zhou K., Jeong M.G., Park S., Kwon Y., Hong T.M., Noh J., Ryu S.H. // *Exp. Mol. Med*. 2021. V. 53. P. 384–392.
<https://doi.org/10.1038/s12276-021-00572-4>
61. Riera R., Hogervorst T.P., Doelman W., Ni Y., Pujals S., Bolli E., Codée J.D.C., van Kasteren S.I., Albertazzi L. // *Nat. Chem. Biol*. 2021. V. 17. P. 1281–1288.
<https://doi.org/10.1038/s41589-021-00896-2>
62. Farrell M.V., Nunez A.C., Yang Z., Pérez-Ferreros P., Gaus K., Goyette J. // *Sci. Signal*. 2022. V. 15. P. eabg9782.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.abg9782>
63. Oi C., Gidden Z., Holyoake L., Kantelberg O., Mochrie S., Horrocks M.H., Regan L. // *Commun. Biol*. 2020. V. 3. P. 458.
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-01188-6>
64. Gwosch K.C., Pape J.K., Balzarotti F., Hoess P., Ellenberg J., Ries J., Hell S.W. // *Nat. Methods*. 2020. V. 17. P. 217–224.
<https://doi.org/10.1038/s41592-019-0688-0>
65. Balzarotti F., Eilers Y., Gwosch K.C., Gynnå A.H., Westphal V., Stefani F.D., Elf J., Hell S.W. // *Science*. 2017. V. 355. P. 606–612.
<https://doi.org/10.1126/science.aak9913>
66. Prakash K., Curd A.P. // *Nat. Methods*. 2023. V. 20. P. 48–51.
<https://doi.org/10.1038/s41592-022-01694-x>
67. Gwosch K.C., Balzarotti F., Pape J.K., Hoess P., Ellenberg J., Ries J., Matti U., Schmidt R., Sahl S.J., Hell S.W. // *Nat. Methods*. 2023. V. 20. P. 52–54.
<https://doi.org/10.1038/s41592-022-01695-w>
68. Wolff J.O., Scheiderer L., Engelhardt T., Engelhardt J., Matthias J., Hell S.W. // *Science*. 2023. V. 379. P. 1004–1010.
<https://doi.org/10.1126/science.ade2650>
69. Deguchi T., Iwanski M.K., Schentarra E.M., Heidebrecht C., Schmidt L., Heck J., Weihs T., Schnorrenberg S., Hoess P., Liu S., Chevyreva V., Noh K.M., Kapitein L.C., Ries J. // *Science*. 2023. V. 379. P. 1010–1015.
<https://doi.org/10.1126/science.ade2676>
70. Ostersehl L.M., Jans D.C., Wittek A., Keller-Findeisen J., Inamdar K., Sahl S.J., Hell S.W., Jakobs S. // *Nat. Methods*. 2022. V. 19. P. 1072–1075.
<https://doi.org/10.1038/s41592-022-01577-1>
71. Mulhall E.M., Gharpure A., Lee R.M., Dubin A.E., Aaron J.S., Marshall K.L., Spencer K.R., Reiche M.A., Henderson S.C., Chew T.L., Patapoutian A. // *Nature*. 2023. V. 620. P. 1117–1125.
<https://doi.org/10.1038/s41586-023-06427-4>
72. Carsten A., Rudolph M., Weihs T., Schmidt R., Jansen I., Wurm C.A., Diepold A., Failla A.V., Wolters M., Aepfelbacher M. // *Methods Appl. Fluoresc*. 2022. V. 11.
<https://doi.org/10.1088/2050-6120/aca880>
73. Pape J.K., Stephan T., Balzarotti F., Büchner R., Lange F., Riedel D., Jakobs S., Hell S.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. V. 117. P. 20607–20614.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2009364117>
74. Gustafsson M.G.L. // *J. Microsc*. 2000. V. 198. P. 82–87.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x>
75. Gustafsson M.G.L., Shao L., Carlton P.M., Wang C.J.R., Golubovskaya I.N., Cande W.Z., Agard D.A., Sedat J.W. // *Biophys. J*. 2008. V. 94. P. 4957–4970.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120345>
76. Manton J.D. // *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci*. 2022. V. 380. P. 20210109.
<https://doi.org/10.1098/rsta.2021.0109>
77. Zhao T., Wang Z., Chen T., Lei M., Yao B., Bianco P.R. // *Front. Phys*. 2021. V. 9. P. 672555.
<https://doi.org/10.3389/fphy.2021.672555>
78. Chen X., Zhong S., Hou Y., Cao R., Wang W., Li D., Dai Q., Kim D., Xi P. // *Light Sci. Appl*. 2023. V. 12. P. 172.
<https://doi.org/10.1038/s41377-023-01204-4>
79. Wang M., Chen J., Wang L., Zheng X., Zhou J., Zeng Y., Qu J., Shao Y., Gao B.Z. // *Chemosensors*. 2021. V. 9. P. 364.
<https://doi.org/10.3390/chemosensors9120364>

80. Hamel V., Guichard P., Fournier M., Guiet R., Fluckiger I., Seitz A., Gonczy P. // *Biomed. Opt. Express*. 2014. V. 5. P. 3326–3336.
<https://doi.org/10.1364/BOE.5.003326>
81. Dake F. // *Opt. Rev.* 2016. V. 23. P. 587–595.
<https://doi.org/10.1007/s10043-016-0234-6>
82. Xue Y., So P.T.C. // *Opt. Express*. 2018. V. 26. P. 20920–20928.
<https://doi.org/10.1364/OE.26.020920>
83. Fiolka R., Beck M., Stemmer A. // *Opt. Lett.* 2008. V. 33. P. 1629–1631.
<https://doi.org/10.1364/OL.33.001629>
84. Roth J., Mehl J., Rohrbach A. // *Biomed. Opt. Express*. 2020. V. 11. P. 4008–4026.
<https://doi.org/10.1364/BOE.391561>
85. Hinsdale T.A., Stallinga S., Rieger B. // *Biomed. Opt. Express*. 2021. V. 12. P. 1181–1194.
<https://doi.org/10.1364/BOE.416546>
86. Heintzmann R., Huser T. // *Chem. Rev.* 2017. V. 117. P. 13890–13908.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00218>
87. Ward E.N., Hecker L., Christensen C.N., Lamb J.R., Lu M., Mascheroni L., Chung C.W., Wang A., Rowlands C.J., Schierle G.S.K., Kaminski C.F. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 7836.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-35307-0>
88. Mennella V. // In: *Encyclopedia of Cell Biology* (Second Edition) / Eds. Ralph A., Hart B.G.W., Stahl P.D. Academic Press, 2023. P. 105–121.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821618-7.00116-4>
89. Hong S., Wilton D.K., Stevens B., Richardson D.S. // *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1538. P. 155–167.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6688-2_12
90. Sulkowski M.J., Han T.H., Ott C., Wang Q., Verheyen E.M., Lippincott-Schwartz J., Serpe M. // *PLoS Genet.* 2016. V. 12. P. e1005810.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005810>
91. Badawi Y., Nishimune H. // *Neurosci. Lett.* 2020. V. 715. P. 134644.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134644>
92. Miao L., Yan C., Chen Y., Zhou W., Zhou X., Qiao Q., Xu Z. // *Cell Chem. Biol.* 2023. V. 30. P. 248–260.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2023.02.001>
93. Mudry E., Belkebir K., Girard J., Savatier J., Le Moal E., Nicoletti C., Allain M., Sentenac A. // *Nat. Photon.* 2012. V. 6. P. 312–315.
<https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.83>
94. Mangeat T., Labouesse S., Allain M., Negash A., Martin E., Guénolé A., Poincloux R., Estibal C., Bouissou A., Cantaloube S., Vega E., Li T., Rouvière C., Allart S., Keller D., Debarnot V., Wang X.B., Michaux G., Pinot M., Le Borgne R., Tournier S., Suzanne M., Idier J., Sentenac A. // *Cell Rep. Methods*. 2021. V. 1. P. 100009.
<https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100009>
95. Labouesse S., Idier J., Sentenac A., Mangeat T., Allain M. // *Random Illumination Microscopy from Variance Images / 28th European Signal Processing Conference (EUSIPCO)*, Amsterdam, Netherlands, 2021. P. 785–789.
<https://doi.org/10.23919/Eusipco47968.2020.9287651>
96. Liu P. // *Appl. Opt.* 2022. V. 61. P. 2910–2914.
<https://doi.org/10.1364/AO.452709>
97. Affannoukoué K., Labouesse S., Maire G., Gallais L., Savatier J., Allain M., Rasedujjaman M., Legoff L., Idier J., Poincloux R., Pelletier F., Leterrier C., Mangeat T., Sentenac A. // *Optica*. 2023. V. 10. P. 1009–1017.
<https://doi.org/10.1364/OPTICA.487003>
98. Axelrod D. // *Traffic*. 2001. V. 2. P. 764–774.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.21104.x>
99. Janco M., Dedova I., Bryce N.S., Hardeman E.C., Gunning P.W. // *Biophys. Rev.* 2020. V. 12. P. 879–885.
<https://doi.org/10.1007/s12551-020-00720-6>
100. Shen H., Huang E., Das T., Xu H., Ellisman M., Liu Z. // *Opt. Express*. 2014. V. 22. P. 10728–10734.
<https://doi.org/10.1364/OE.22.010728>
101. Fish K.N. // *Curr. Protoc. Cytom.* 2009. V. 12. P. Unit12.18.
<https://doi.org/10.1002/0471142956.cy1218s50>
102. McCluskey K., Dekker N.H. // *Opt. Commun.* 2023. V. 538. P. 129474.
<https://doi.org/10.1016/j.optcom.2023.129474>
103. Fan D., Cnossen J., Hung S.-T., Kromm D., Dekker N.H., Verbiest G.J., Smith G.S. // *Opt. Commun.* 2023. V. 542. P. 129548.
<https://doi.org/10.1016/j.optcom.2023.129548>
104. Soubies E., Radwanska A., Grall D., Blanc-Féraud L., Van Obberghen-Schilling E., Schaub S. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 1926.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36119-3>
105. Jung Y., Riven I., Feigelson S.W., Kartvelishvily E., Tohya K., Miyasaka M., Alon R., Haran G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. P. E5916–E5924.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1605399113>

106. Szalai A.M., Siarry B., Lukin J., Williamson D.J., Unsain N., Cáceres A., Pilo-Pais M., Acuna G., Re-fojo D., Owen D.M., Simoncelli S., Stefani F.D. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 517.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-20863-0>
107. Young L.J., Ströhl F., Kaminski C.F.A. // *J. Vis. Exp.* 2016. V. 111. P. e53988.
<https://doi.org/10.3791/53988>
108. Opstad I.S., Ströhl F., Fantham M., Hockings C., Vanderpoorten O., van Tartwijk F.W., Lin J.Q., Tinguely J.-C., Dullo F.T., Kaminski-Schierle G.S., Ahluwalia B.S., Kaminski C.F. // *J. Biophotonics.* 2020. V. 13. P. e201960222.
<https://doi.org/10.1002/jbio.201960222>
109. Villegas-Hernández L.E., Dubey V., Nystad M., Tinguely J.-C., Coucheron D.A., Dullo F.T., Priyadarshi A., Acuña S., Ahmad A., Mateos J.M., Barmettler G., Ziegler U., Birgisdottir Á.B., Karlsson Hovd A.-M., Fenton K.A., Acharya G., Agarwal K., Ahluwalia B.S. // *Light Sci. Appl.* 2022. V. 11. P. 43.
<https://doi.org/10.1038/s41377-022-00731-w>

Modern Methods of Fluorescence Nanoscopy in Biology

D. O. Solovyeva^{*,#}, A. V. Altunina^{*,}, M. V. Tretyak^{*},
K. E. Mochalov^{*}, and V. A. Oleinikov^{*}**

[#] Phone: +7 (965) 392-24-91; e-mail: d.solovieva@mail.ru

^{*} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**} Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia

^{***} National Research Nuclear University “MEPhI”, Kashirskoye sh. 31, Moscow, 115409 Russia

Optical microscopy has undergone significant changes in recent decades due to the breaking of the diffraction limit of optical resolution and the development of high-resolution imaging techniques, which are collectively known as fluorescence nanoscopy. These techniques allow researchers to observe biological structures and processes at a nanoscale level of detail, revealing previously hidden features and aiding in answering fundamental biological questions. Among the advanced methods of fluorescent nanoscopy are: STED (Stimulated Emission Depletion Microscopy), STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy), PALM (Photo-activated Localization Microscopy), TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence), SIM (Structured Illumination Microscopy), MINFLUX (Minimal Photon Fluxes), PAINT (Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography) и RESOLFT (REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions) and others. In addition, most of these methods make it possible to obtain volumetric (3D) images of the objects under study. In this review, we will look at the principles of these methods, their advantages and disadvantages, and their application in biological researches.

Keywords: optical microscopy, fluorescence microscopy, super resolution, fluorescence nanoscopy, diffraction limit



УДК 615.331, 577.188

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ДВУХКОМПОНЕНТНОГО ЛАНТИБИОТИКА ЛИХЕНИЦИДИНА В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ

© 2024 г. Д. В. Антошина*, С. В. Баландин*, **, А. А. Тагаев*,
А. А. Потемкина*, **, Т. В. Овчинникова*, **, #

* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** Физтех-школа биологической и медицинской физики, Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет),
Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

Поступила в редакцию 10.03.2024 г.

После доработки 21.03.2024 г.

Принята к публикации 22.03.2024 г.

Лантибиотики представляют собой семейство рибосомально синтезируемых бактериальных антимикробных пептидов, которые подвергаются посттрансляционной модификации с образованием остатков лантионина (Lan) и метиллантионина (MeLan). Лантибиотики рассматриваются как перспективные средства для борьбы с антибиотикорезистентными бактериальными инфекциями. В настоящей работе представлен биотехнологический способ получения двух компонентов лантибиотика лихеницидина из *Bacillus licheniformis* B-511 – Lch α и Lch β . Разработана система, позволяющая проводить в клетках *Escherichia coli* коэкспрессию генов lchA1 или lchA2, кодирующих предшественники α - или β -компонентов, соответственно, с генами lchM1 или lchM2 модифицирующих ферментов LchM1 и LchM2. Разработанная система гетерологичной экспрессии и очистки позволила получить с высоким выходом посттрансляционно модифицированный рекомбинантный Lch β , полностью идентичный природному пептиду по структуре и биологической активности.

Ключевые слова: антибиотики, антимикробные пептиды, бактериоцины, лантибиотики, рекомбинантные пептиды, биотехнология

DOI: 10.31857/S0132342324040081, **EDN:** MWYNGK

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день поиск и разработка новых антимикробных препаратов выступают критически важными из-за широкого распространения заболеваний, вызванных антибиотикорезистентными инфекциями. Несмотря на успехи в создании синтетических антибиотиков, большой интерес представляют природные защитные соединения, в частности, антимикробные пептиды

(АМП) и их аналоги. АМП обнаружены в различных природных источниках – от бактерий до млекопитающих – и играют важную роль в регулировании микробных сообществ и иммунной защите многоклеточных организмов, обеспечивая им невосприимчивость к патогенным микроорганизмам.

Бактериоцины – рибосомально синтезируемые АМП [1, 2], продуцируемые многими грамположительными и грамотрицательными бактериями,

Сокращения: АМП – антимикробные пептиды.

Автор для связи: (эл. почта: ovch@ibch.ru).

а также археями. В настоящее время известно несколько систем классификации бактериоцинов, основанных на различиях в химической структуре, биологической активности и механизмах действия [3]. Небольшие термостабильные бактериоцины молекулярной массой менее 10 кДа подразделяют на два класса. К классу I относят бактериоцины, содержащие посттрансляционные модификации, а к классу II — немодифицируемые пептиды. Среди посттрансляционно модифицируемых бактериоцинов наиболее многочисленное и хорошо исследованное семейство составляют лантибиотики, многие из которых имеют потенциал медицинского применения в качестве эффективных антимикробных средств [4]. Характерной особенностью лантибиотиков является наличие таких нетипичных аминокислотных остатков, как лантионин (Lan, Ala-S-Ala) и метиллантионин (MeLan, Abu-S-Ala), которые образуются в результате циклизации при взаимодействии дегидратированных остатков Ser (2,3-дегидроаланин, Dha) и Thr (2,3-дегидробутирин, Dhb) с остатками Cys с образованием тиоэфирных связей при участии специфичных модифицирующих ферментов [1]. В зависимости от структуры и механизма ферментативного катализа при формировании тиоэфирных связей лантипептиды подразделяются на четыре класса, при этом большинство лантипептидов с антибиотической активностью (лантибиотиков) относятся к классам I и II [5]. Лантибиотики класса I и их типичный представитель низин — широко используемый пищевой консервант E234 — претерпевают посттрансляционную модификацию при участии двух различных ферментов: LanB, осуществляющего дегидратацию остатков Ser и Thr, и LanC, катализирующего циклизацию с образованием тиоэфирных связей. Модификацию лантибиотиков класса II осуществляет один бифункциональный фермент — LanM.

Среди лантибиотиков класса II отдельную подгруппу составляют двухкомпонентные лантибиотики [1, 5]. Данные пептиды отличаются тем, что функционируют в виде двух отдельных компонентов (α и β), каждый из которых кодируется отдельным геном (*lanA1* и *lanA2*) и модифицируется при участии особого фермента (LanM1 или LanM2). Каждый из компонентов обладает самостоятельной антимикробной активностью, однако антимикробный эффект значительно возрастает при их совместном синер-

гическом действии. На сегодняшний день известно 13 представителей двухкомпонентных лантибиотиков: лактицин 3147 [6], стафилококцин [7], плантарицин W [8], ВНТ [9], Smb [10], лихеницидин [11–14], галодурацин [15], энтероцин W [16], флавецин [17], бицереуцин [18], тузин [19], формицин [20] и розеоцин [21]. Ранее нами был выделен двухкомпонентный лантибиотик лихеницидин из *Bacillus licheniformis* VK21, состоящий из компонентов Lch α и Lch β и обладающий активностью в отношении грамположительных бактерий в наномолярном диапазоне концентраций [12]. Нами была установлена структура обоих компонентов лихеницидина [12] и исследован механизм действия Lch α [14]. Строение зрелых компонентов Lch α и Lch β , схематичное представление их посттрансляционной модификации, а также структурная организация кластера генов биосинтеза лихеницидина изображены на рис. 1.

Ввиду сложности процесса созревания лантибиотиков и многостадийности внесения посттрансляционных модификаций природными системами биосинтеза получение достаточных количеств полностью модифицированных пептидов даже для их первоначальных структурно-функциональных исследований зачастую становится нетривиальной задачей. Во многих случаях выход зрелых лантибиотиков при очистке из культур природных продуцентов измеряется микрограммами на 1 л культуральной жидкости. Разработка биотехнологических систем для получения рекомбинантных лантибиотиков может позволить решить эту проблему, а также дать в руки исследователей удобный инструмент для дальнейшего изучения этих перспективных антимикробных соединений. Известны системы гетерологичной экспрессии генов лантибиотиков (в первую очередь, принадлежащих к классу I) на основе *Lactococcus lactis* и *Bacillus subtilis*. В ряде работ [22, 23] была показана возможность получения лантибиотиков лихеницидина и галодурацина в гетерологичной системе на основе *E. coli*. Однако, указанная методика получения рекомбинантного лихеницидина включает последовательные стадии экстракции примесей и целевого пептида органическими растворителями, что повышает её трудоемкость и лишает универсальности, необходимой для препаративной наработки и очистки потенциального прототипа фармацевтической субстанции. Настоящая ра-

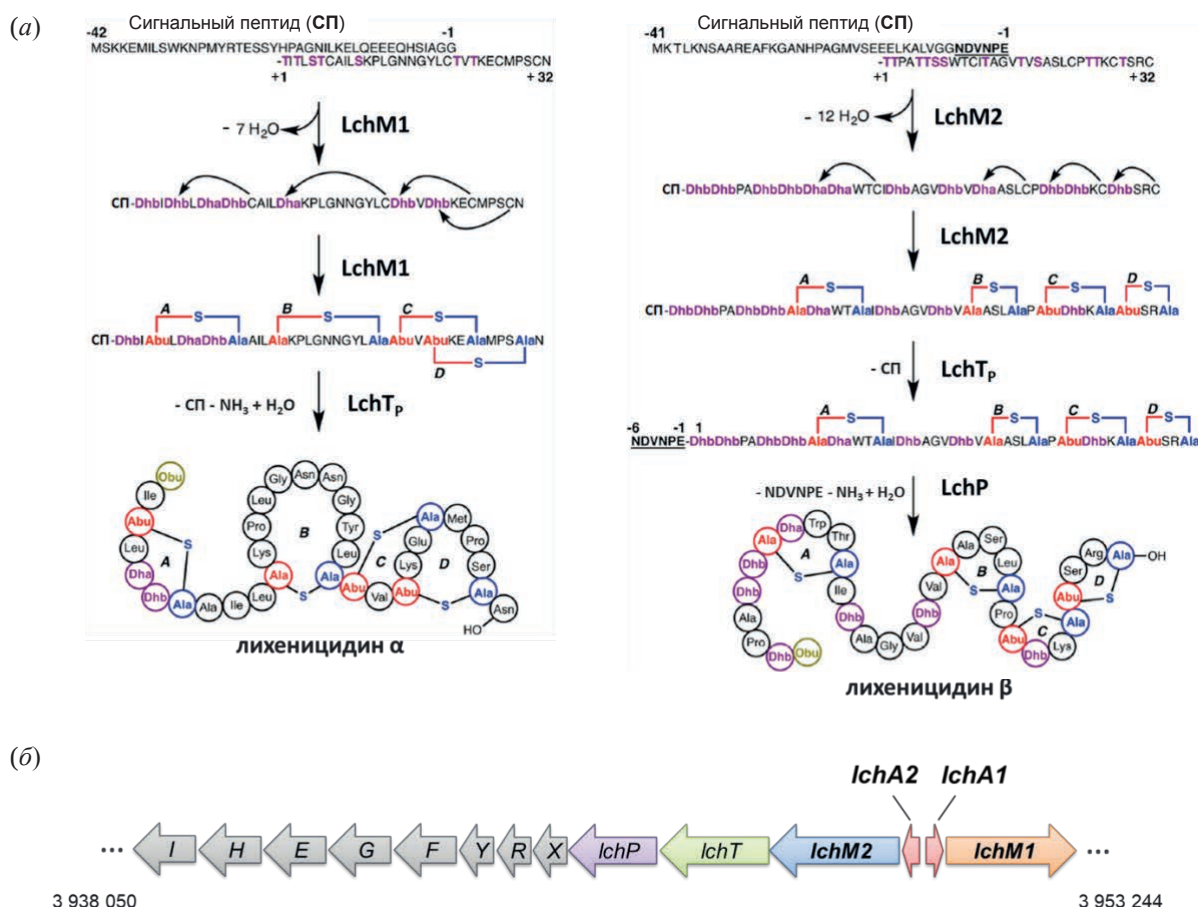


Рис. 1. (а) Схема биосинтеза и модификации компонентов лихеницидина [4]; (б) структурная организация кластера биосинтеза лихеницидина из *B. licheniformis* VK21 [12].

бота посвящена разработке биотехнологического способа получения рекомбинантного двухкомпонентного лантибиотика лихеницидина из *B. licheniformis* B-511 в гетерологичной системе экспрессии в клетках *E. coli* BL21(DE3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка биотехнологического способа получения посттрансляционно модифицированных компонентов лихеницидина

Необходимость разработки способа получения рекомбинантного лихеницидина была обусловлена низкими выходами, которые наблюдались при очистке его компонентов из штаммов *B. licheniformis* VK21 и B-511 (порядка 0,1 мг/л для Lchα и 0,01 мг/л для Lchβ). В ходе данного исследования мы разработали биотехнологическую систему, которая позволяет получать реком-

бинантные посттрансляционно модифицированные компоненты лихеницидина путём гетерологичной экспрессии в штамме *E. coli* BL21(DE3). Для этого нами были спроектированы и получены конструкции на основе плазмид серии pET, в которые были встроены последовательности генов, кодирующих предшественники компонентов лихеницидина (SP1LchA1 и SP2LchA2), включая сигнальные последовательности SP1 и SP2, и гены ферментов для их модификации (LchM1 и LchM2). Синтез полинуклеотидных последовательностей, кодирующих компоненты лихеницидина, проводили методом ПЦР путём амплификации целевых генов на матрице геномной ДНК штамма *B. licheniformis* B-511, идентичного штамму ATCC 14580. Сравнение штаммов *B. licheniformis* VK21 и B-511 показало, что они имеют одинаковые гены *lchA1*, *lchA2* и *lchM2* и неболь-

шие отличия в гене *lchM1*, которые сводятся к заменам в пяти положениях (Val373Ala, Leu707Phe, Ile771Val, Lys818Arg, Leu946Phe). Как нами было установлено, эти замены не оказывают значительного влияния на активность фермента, поскольку указанные мутации локализованы в участках структуры фермента, отдаленных от каталитических центров дегидратации и циклизации. Каждую из полученных нуклеотидных последовательностей встраивали в вектор методом гомологичной рекомбинации *in vivo* в клетках *E. coli* DH10B. Остатки Met в структуре предшественника каждого из пептидов заменяли на Leu, что позволило использовать реакцию с бромцианом для удаления гистидиновой метки и сигнальной части пропептида. Дополнительные модификации обеих нуклеотидных последовательностей (введение мутаций в гены пептидов и ферментов, удаление гена белка-носителя) осуществляли методом сайт-направленного мутагенеза с использованием амплификации полноразмерной плазмиды методом обратной ПЦР с мутагенизирующими праймерами [24]. Дальнейшую рециклизацию осуществляли путём гомологичной рекомбинации. В ходе оптимизации системы экспрессии рекомбинантных компонентов лихеницидина было показано, что присутствие белка-носителя тиоредоксина (TrxL), повышающего растворимость и выход гибридных белков, не препятствует осуществлению модификаций предшественников компонентов лихеницидина ферментами LchM1 и LchM2. Однако, наличие белка-носителя в смеси продуктов реакции с бромцианом затрудняло очистку зрелых компонентов лихеницидина из-за близких значений времени удерживания белков на колонке при проведении обращённо-фазовой ВЭЖХ (офВЭЖХ), вследствие чего было решено отказаться от его использования. Схема экспрессионных плазмид для получения рекомбинантных компонентов лихеницидина представлена на рис. 2.

Гетерологичная экспрессия и модификация компонентов лихеницидина в *E. coli*

Для получения каждого из пептидов проводили трансформацию Ca^{2+} -компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3) соответствующей плазмидой и дальнейшую коэкспрессию каждого из пред-

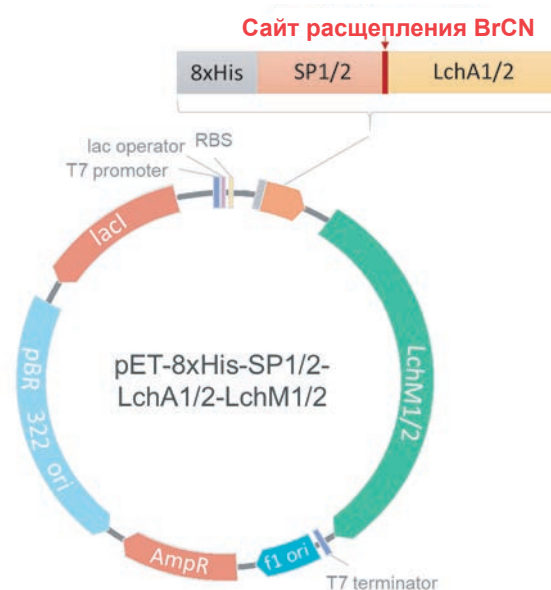


Рис. 2. Схематичное представление экспрессионных плазмид для получения рекомбинантных компонентов лихеницидина.

шественников компонентов лихеницидина и соответствующего ему модифицирующего фермента. При этом биосинтез, модификация и накопление компонентов происходили в цитоплазме клеток *E. coli*. Очистка включала в себя металлохелатную хроматографию в денатурирующих условиях, отщепление олигогистидиновой метки и сигнальной части пропептида с помощью реакции с бромцианом в кислой среде и разделение продуктов реакции с помощью офВЭЖХ. Важно отметить, что в ходе совместной экспрессии предшественника пептида с ферментом его модификации синтезировался набор модифицированных форм с разной степенью зрелости (с различным числом фосфорилированных и дегидратированных остатков и тиоэфирных связей), имеющих различные времена удерживания на колонке при разделении методом офВЭЖХ. Хроматограммы очистки рекомбинантных компонентов Lch α и Lch β , а также масс-спектрометрический анализ фракций, предположительно содержащих целевые зрелые пептиды, представлены на рис. 3 и 4.

Как видно из хроматограммы и масс-спектра фракции, содержащей Lch α , в ходе коэкспрессии значительная часть пептида оставалась в немо-

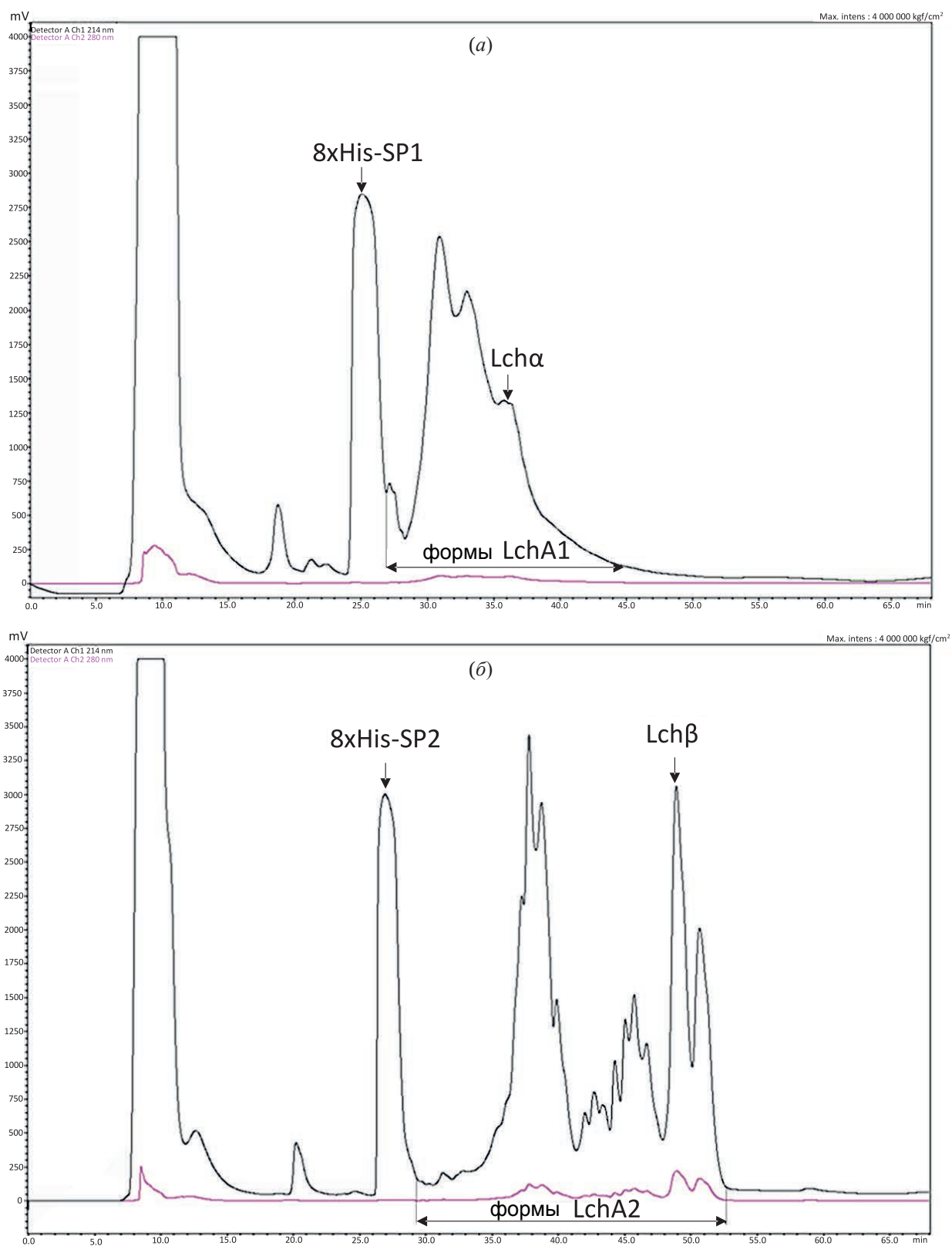


Рис. 3. Хроматограммы очистки полученных рекомбинантных компонентов лишеницидина с помощью обращённо-фазовой ВЭЖХ. (а) – Lch α и другие незрелые формы LchA1, (б) – Lch β и другие незрелые формы LchA2.

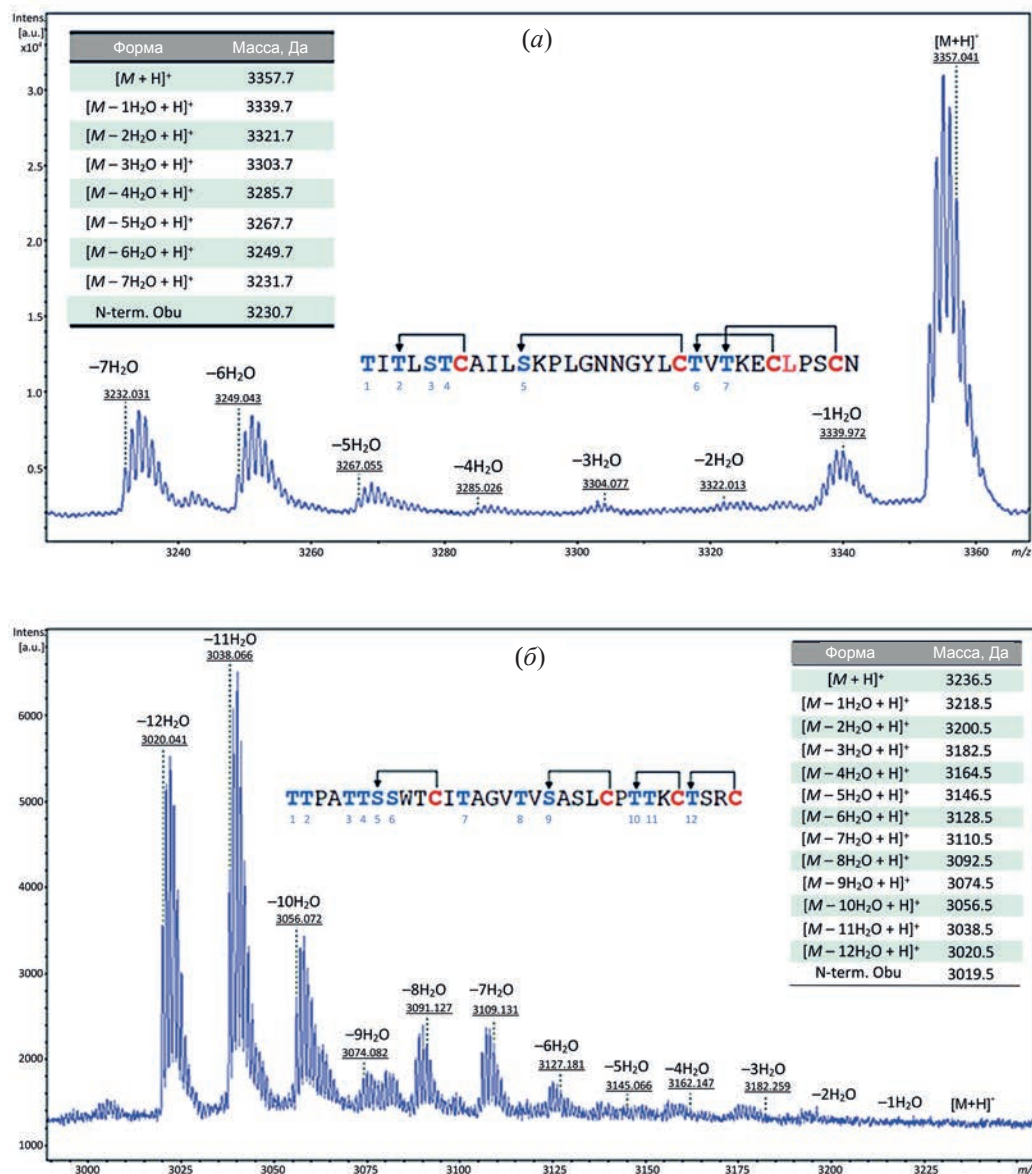


Рис. 4. МАЛДИ-масс-спектрометрический анализ полученных рекомбинантных компонентов лихеницидина. (а) – LchA1, (б) – LchA2. (а) – Lch α и другие незрелые формы LchA1; (б) – Lch β и другие незрелые формы LchA2.

дифицированной форме. Лишь небольшая фракция имела в своей структуре все семь необходимых дегидратаций. Исходя из предположения, что низкая модифицирующая активность фермента LchM1 могла быть связана с низкой стабильностью его мРНК, мы повторили эксперимент с использованием штамма *E. coli* BL21 Star (DE3), мутантного по гену РНКазы E. При этом уровень экспрессии гена *lchM1* значительно повысился, что привело к возрастанию суммарной доли полностью дегидратированной ($-7 H_2O$) и предшествующей ей

($-6 H_2O$) форм Lch α . Тем не менее, оставшаяся часть пептида все ещё была представлена преимущественно недегидратированной формой. Варьирование условий коэкспрессии генов *lchA1* и *lchM1* (введение осмолитов в состав питательной среды, снижение температуры инкубации до 16°C , использование автоиндукции лактозой, изменение продолжительности культивирования) также не привело к повышению выхода зрелой формы пептида Lch α .

Напротив, рекомбинантный компонент Lch β был получен нами в аналогичной системе экспрессии с высоким выходом, составившим около 4 мг с 1 л культуры. На стадии оФВЭЖХ был получен ряд пиков (рис. 4б), среди которых с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии удалось выявить фракцию, содержащую пептид с молекулярной массой, соответствующей природному β -компоненту лихеницидина ($M_{\text{расч}} \sim 3019.5$ Да). Идентичность структуры полученного рекомбинантного Lch β с природным была подтверждена с помощью ЯМР-спектроскопии (данные не приведены). Таким образом, ферментативная активность LchM2 в полученной системе обеспечивает эффективное отщепление 12 молекул воды от предшественника пептида и образование четырех внутримолекулярных тиоэфирных связей.

Получение природных α - и β -компонентов лихеницидина из *B. licheniformis* B-511 проводили по ранее описанной нами методике [12]. Хроматограмма очистки пептидов с помощью оФВЭЖХ и МАЛДИ масс-спектрометрический анализ полученных фракций пептидов представлены на рис. 5.

Дополнительным подтверждением идентичности рекомбинантных компонентов природному лихеницидину стали результаты тестирования их антимикробной активности. Из-за малого количества получаемой зрелой формы Lch α , ее активность была протестирована только в отношении штамма *Listeria monocytogenes* EGD методом диффузии в твердую агаризованную среду, в результате чего была обнаружена зона ингибирования, свидетельствующая о наличии антимикробных свойств. Полученная зрелая форма рекомбинантного Lch β проявила антимикробную активность в аналогичном тесте только в отношении штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и не была активной в отношении других тестируемых штаммов бактерий. Однако в тестах методом серийных разведений в жидкой среде рекомбинантный Lch β показал активность в отношении других штаммов бактерий (табл. 1). Кроме того, рекомбинантный Lch β продемонстрировал синергизм при совместном действии с природным α -компонентом лихеницидина в отношении *L. monocytogenes* EGD (рис. 6) по результатам тестирования в твердой агаризованной и в жидкой среде (табл. 1).

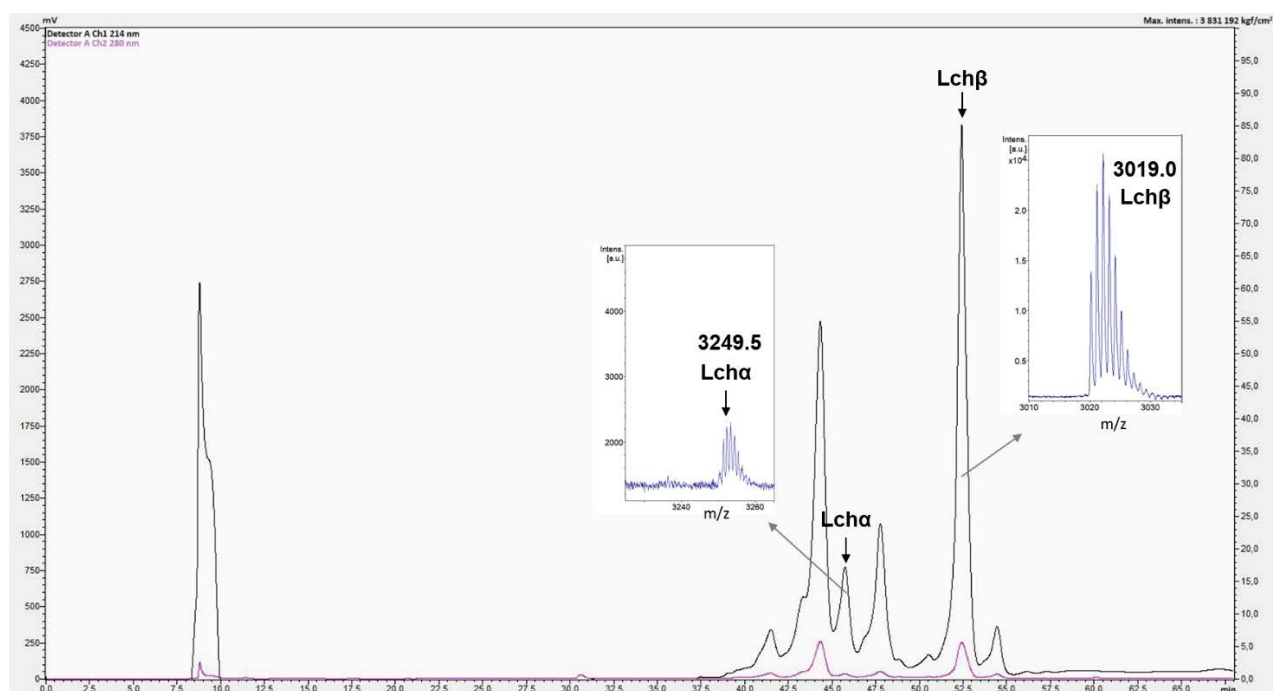


Рис. 5. Хроматограмма очистки природного лихеницидина с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ и МАЛДИ-масс-спектрометрический анализ выделенных природных компонентов лихеницидина.

Таблица 1. Антимикробная активность полученных компонентов лихеницидина в отношении чувствительных тест-штаммов бактерий

Тестируемый штамм	МИК, мкМ					
	Rβ	Nβ	Na	Na + Nβ	Na + Rβ	Низин
<i>Micrococcus luteus</i> Ac-2229	> 128	> 32	4	0.125 + 0.125	0.25 + 0.25	0.0156
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD	> 128	> 32	>16	2 + 2	2 + 2	0.0625
<i>Bacillus subtilis</i> B-886	32	32	32	1 + 1	2 + 2	0.0313
<i>Mycobacterium phlei</i> Ac-1221	32	32	16	4 + 4	4 + 4	0.25

* Na – природный Lch α ; Nβ – природный Lchβ; Rβ – рекомбинантный Lchβ; МИК – минимальная ингибирующая концентрация.

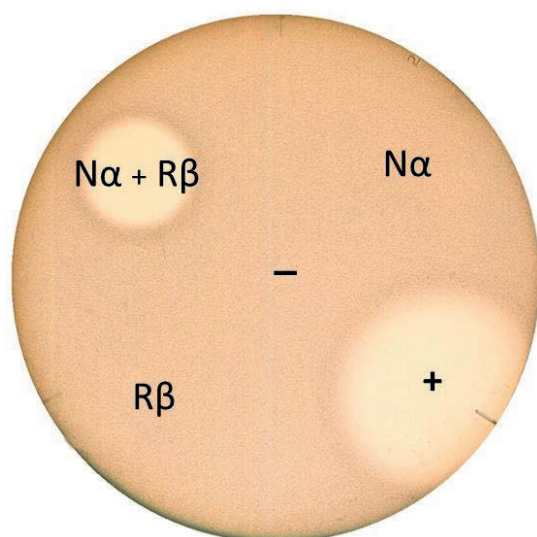


Рис. 6. Синергическое действие эквимольной смеси природного Lch α (Na) и рекомбинантного Lchβ (Rβ) в отношении *L. monocytogenes* EGD (суммарная концентрация смеси пептидов – 1.0 мкг; концентрация Na или Rβ – 1.0 мкг; (+) контроль – тетрациклин в концентрации 1.0 мкг; (–) контроль – 5% ацетонитрил, 0.1% трифторуксусная кислота.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение плазмидных конструкций. Для получения нуклеотидных последовательностей, кодирующих предшественники компонентов лантибиотика лихеницидина LchA1 и LchA2 и модифицирующие их ферменты LchM1 и LchM2, соответственно, проводили амплификацию их генов на матрице геномной ДНК природного продуцента *B. licheniformis* B-511 (GeneBank:

AAU25566.1, AFR74837.1, ADM36019.1, AAU42939.1) с помощью ПЦР. Синтезированные нуклеотидные последовательности встраивали в вектор pET-8xHis-TrxL из коллекции УНЦ ИБХ РАН методом гомологичной рекомбинации *in vivo* [24] в клетках *E. coli* DH10B. В случае *lchA1* с помощью ПЦР синтезировали мутантный ген, кодирующий предшественник α -компонента лихеницидина LchA1 с заменой остатков M5L и M13L в сигнальной части, а также M28L в модифицируемой части пептида. Использованные в работе последовательности олигонуклеотидных праймеров приведены в табл. 2. Правильность сборки полученных плазмидных конструкций оценивали с помощью секвенирования по Сэнгеру (ЗАО «Евроген»). Для повышения достоверности полученных данных каждый клонированный фрагмент секвенировали дважды в противоположных направлениях.

Получение рекомбинантных компонентов лихеницидина. Штаммы-продуценты рекомбинантных компонентов лихеницидина получали путем трансформации Ca²⁺-компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3) плазмидой, кодирующей октагистидин-меченый препропептид и фермент его модификации. Трансформированные клетки выращивали в течение 16 ч при 37°C в 10 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 20 мМ глюкозы и вносили в 1.0 л среды LB для экспрессии, содержащей 20 мМ глюкозы, 1 мМ MgSO₄ и 100 мкг/мл ампициллина. Культивирование осуществляли в термостатируемом шейкере при

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидных праймеров для ПЦР

№	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Назначение
1	ACGGATCCTCAAAAAAGGAAGTATTCTTTCATGGAAAAATCC	Получение ампликона SP1LchA1_M13L-LchM1
2	TCTGTATCGCACTGAATCTTCT	
3	TTCCTTTTTTGAGGATCCGTGATG	
4	ACGGATCCTCAAAAAAGGAAGTATTCTTTCATGGAAAAATCCTCTGTATCGC ACTGAATCTTCT	
5	CAGTTCCTTTTTTGAGGATCCGTGAT	Мутагенез сигнальной последовательности LchA1 (SP1_M5L, M13L)
6	CCTCGACGCTAACCTGGCCGGATCCCATCA CCACCACCATCACGGAAAAACACTGAAAAATTC	Получение ампликона SP2LchA2-LchM2
7	ACGGAAAAACACTGAAAAATTCAGCTGCCCCGTG AAGCCTTCAAAGGAGCCAATCATCCGG	
8	AGGAGCCAATCATCCGGCAGGGCTGGTTTCCGA AGAGGAATTGAAAGCTTTGGTAGGAGG	
9	TTGAAAGCTTTGGTAGGAGGAAATGACGTCAAT CCTGAAATGACAACTCCTGCTACAACC	
10	GTGGTGGTGGTGTCTGAGAGAATTCTCACCTGCCCGTC	

37°C, 220 об/мин в течение 2–3 ч до плотности 0.8–1.0 OD₆₀₀/мл, после чего добавляли индуктор изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0.2 мМ. Продолжали инкубацию клеточной культуры при температуре 30°C, 220 об/мин в течение 3–4 ч. Клеточную массу осаждали центрифугированием при скорости 4000 об/мин и температуре 4°C в течение 10 мин. Полученный клеточный осадок замораживали и хранили при температуре минус 20°C.

Выделение и очистка рекомбинантных компонентов лихеницидина. Металлохелатная хроматография. Клеточный осадок гомогенизировали с помощью ручного стеклянного гомогенизатора до однородной суспензии в буфере А для металлохелатной хроматографии (6 М гуанидина гидрохлорид, 100 мМ NaH₂PO₄, 30 мМ имидазол, pH 7.8), добавляя 9 мл буфера на 1 г осадка. Далее проводили ультразвуковой лизис полученной клеточной суспензии на льду в циклическом режиме (400 Дж на 1 мл суспензии). Центрифугировали лизат при скорости 17000 об/мин (30000 g) и температуре 4°C в течение 30 мин.

Гибридные белки, содержащие модифицированные предшественники пептидов Lchα и Lchβ, N-концевую октагистидиновую метку (8xHis) и сигнальный пептид (SP1 или SP2), очищали в денатурирующих условиях с помощью Ni²⁺-металлохелатной аффинной хроматографии на колонке (d = 1 см, h = 8 см), содержащей сорбент Ni-сефарозу 6 Fast Flow (GE Healthcare, США). Очистку проводили при нормальном давлении и скорости потока буферных растворов 1 мл/мин. Элюцию пептидов проводили с помощью буфера В для металлохелатной хроматографии (6 М гуанидина гидрохлорид, 100 мМ NaH₂PO₄, 500 мМ имидазол, pH 7.8). Время выхода гибридного белка детектировали по изменению оптического поглощения при длине волны 280 нм.

Отщепление вспомогательных аминокислотных последовательностей. Расщепление гибридного белка по остатку метионина, введенному между сигнальной последовательностью и зрелым пептидом, осуществляли с помощью реакции с бромцианом в кислой среде. К 1 мл элюата в буфере В для металлохелатной хроматографии до-

бавляли 50 мкл 50% раствора бромциана, достигая приблизительно 100-кратного молярного избытка по отношению к остаткам метионина в составе белка, и 54 мкл концентрированной HCl (до расчетного значения pH ~ 1.0). Смесь инкубировали в темноте в течение 16–20 ч при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением двухкратного объема воды. Образец упаривали до исходного объема на вакуумном концентраторе SpeedVac в течение 3 ч для удаления избытка бромциана и HCl. Полученные образцы титровали 4 M NaOH до значения pH 4.0.

Обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (офВЭЖХ). Финальную очистку рекомбинантных пептидов проводили с помощью офВЭЖХ на колонке Reprosil-Pur C18-AQ ($d = 5$ мкм, 250×10 мм) в системе буферов A1 (5% ацетонитрил, 0.1% трифторуксусная кислота) и B1 (80% ацетонитрил, 0.1% трифторуксусная кислота). Разделение смеси продуктов проводили при скорости потока 2 мл/мин в градиенте концентрации ацетонитрила от 5 до 80% буфера B1. Время выхода пептида детектировали по изменению оптического поглощения элюата при 214 и 280 нм. Собранные фракции элюата, соответствующие пикам целевых пептидов на хроматограмме, собирали и упаривали досуха на вакуумном концентраторе SpeedVac. При необходимости проводили повторную очистку с помощью офВЭЖХ на отдельной колонке Reprosil-Pur C18-AQ в тех же условиях.

Уровень экспрессии гибридных белков и ферментов LchM1 и LchM2, степень расщепления бромцианом и качество хроматографической очистки контролировали с помощью белкового электрофореза в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле.

Получение и выделение природного лихеницидина. Получение и очистку лихеницидина из природного продуцента *B. licheniformis* B-511 и его дальнейшую очистку проводили по ранее описанной нами методике [12].

Культуру клеток *B. licheniformis* B-511 выращивали на чашке с LB-агаром при 37°C в течении 18 ч, затем клетки переносили в 50-миллилитровую пробирку с 10 мл минимальной среды M9 (4.8 mM Na_2HPO_4 , 2.2 mM KH_2PO_4 , 0.85 mM NaCl, 1.87 mM

NH_4Cl) и проводили культивирование в течение 18 ч на роторной качалке при 37°C и скорости вращения 220 об/мин. Препаративное культивирование проводили в двухлитровых колбах. В каждую колбу добавляли по 160 мл минимальной среды M9 и по 1–2 мл ночной культуры клеток. Проводили культивирование в течение 18 ч на роторной качалке при 37°C и скорости вращения 220 об/мин. Состав ростовой среды M9 с добавками: (4.8 mM Na_2HPO_4 , 2.2 mM KH_2PO_4 , 0.85 mM NaCl, 1.87 mM NH_4Cl), 20 mM глюкоза, 2 mM MgSO_4 , 0.1 mM CaCl_2 , 0.001% тиамин, 10 мкM FeCl_3 , 0.00004% среда «2-3-1» (2% триптон, 3% дрожжевой экстракт, 1% NaCl).

По окончании культивирования клетки отделяли центрифугированием при 8000 g в течение 30 мин. К 1 л супернатанта добавляли 400 мл н-бутанола и проводили однократную экстракцию в течение 16 ч. Водную фазу удаляли с помощью делительной воронки, а полученный экстракт упаривали досуха на роторном испарителе. Перерастворяли образец в 50 мл буфера A2 (30 mM ацетат аммония, pH 5.6, 30% ацетонитрил) и наносили на колонку с носителем Диасорб-100-С8 (2.5×10 см), уравновешенную буфером A2, при скорости потока 2 мл/мин. Элюцию проводили 50 мл буфера B2 (30 mM ацетат аммония, pH 5.6, 80% ацетонитрил) при скорости потока 2 мл/мин. Полученный элюат упаривали на роторном испарителе досуха и перерастворяли в 3 мл 50% метанола. Финальную очистку компонентов природного лихеницидина проводили с помощью офВЭЖХ, как было описано выше для рекомбинантного пептида.

Анализ структуры полученных пептидов. МАЛДИ-масс-спектрометрия. Масс-спектрометрический анализ полученных пептидов проводили на МАЛДИ-времяпролетном масс-спектрометре Reflex III (Bruker Daltonics, Германия), оснащённом УФ-лазером с рабочей длиной волны 337 нм. В качестве матрицы использовали 10 мг/мл 2,5-дигидроксibenзойной кислоты в 20% ацетонитриле, содержащем 0.1% ТФУ.

ЯМР-спектроскопия. Сопоставление структуры рекомбинантного и природного β -компонентов лихеницидина проводилось в лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН. Спектры ЯМР измеряли на спектрометрах AVANCE-III 600 и AVANCE-III 800, ос-

нащенных криогенно охлаждаемыми зондами (Bruker, Германия). Отнесение сигналов ^1H было получено по стандартной методике с использованием 2D-спектров ^1H , ^1H -TOCSY и ^1H , ^1H -NOESY.

Тестирование антимикробной активности.

Первичный скрининг антимикробной активности компонентов лихеницидина и их эквимольной смеси осуществляли методом диффузии в твердую агаризованную среду, содержащую тестовый штамм бактерий. Тест-культуру бактерий выращивали в 10 мл жидкой питательной среды при 37°C до достижения оптической плотности $\text{OD}_{600} \sim 1.0$. Аликвоту полученной культуры добавляли к 10 мл расплавленного и охлажденного до 40°C агара в той же питательной среде до расчётного значения $\text{OD}_{600} 0.001$ (приблизительно 2×10^5 КОЕ/мл). Приготовленные растворы заливали в чашки Петри. На поверхность застывшего агара наносили от 0.5 до 10 мкг тестируемых веществ. В качестве положительного контроля использовали антибиотики ампициллин или тетрациклин. Чашки инкубировали в термостате в течение 24 ч при 37°C .

Антимикробную активность пептидов также определяли методом двойных серийных разведений в жидкой питательной среде. Тестирование проводили в стерильных 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетах (Eppendorf, Германия) в среде Мюллера-Хинтона (МН) (Sigma-Aldrich, США). Тест-культуры выращивали в жидкой питательной среде LB или МН при 37°C до достижения оптической плотности $\text{OD}_{600} \sim 1.0$, после чего разбавляли двухкратной средой МН до конечной концентрацией клеток 10^6 КОЕ/мл. Двойные серийные разведения исследуемых растворов компонентов лихеницидина проводили в лунках планшета в объёме 50 мкл в 0.1% стерильном растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) для предотвращения нежелательной сорбции пептидов. После этого в лунки вносили по 50 мкл приготовленных растворов бактериальных тест-культур и инкубировали планшеты в течение 24 ч при температуре 37°C и перемешивании со скоростью 950 об/мин. Значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) определяли как минимальную концентрацию пептида, при которой не наблюдалось видимого роста бактериальной культуры. Бактериальный рост оцени-

вали визуально. При необходимости дополнительно добавляли в лунки по 20 мкг/мл хромогенного субстрата резазурина (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали планшеты в течение 2 ч при 37°C и перемешивании со скоростью 950 об/мин. Эксперименты по определению МИК проводили в трехкратной повторности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка способов биотехнологического получения антибиотиков является необходимым условием для проведения всесторонних исследований этих антимикробных соединений как перспективных прототипов новых лекарственных средств. Создание гетерологичных суперпродуктов на основе микроорганизмов, в которых гены антибиотиков экспрессируются в контролируемых условиях, облегчает исследование механизмов их биосинтеза и секреции, а также изучение субстратной специфичности модифицирующих ферментов. В дальнейшем это позволит расширить область применения данных природных биосинтетических систем. Разработанный нами биотехнологический способ получения рекомбинантных компонентов антибиотика лихеницидина одновременно демонстрирует возможности, которые открывает данный подход, и трудности на пути его реализации, которые могут быть связаны с особенностями конкретных ферментов или их субстратов. Достигнутые выходы рекомбинантного пептида Lch β позволяют предположить, что модифицирующий фермент LchM2 может быть использован для модификации альтернативных субстратов и для получения других лантипептидов класса II в бактериальных системах экспрессии.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-14-00380 (<https://rscf.ru/project/22-14-00380/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Антошина Д.В. и Баландин С.В. собрали и проанализировали литературные и экспериментальные данные, а также подготовили начальную версию рукописи. Антошина Д.В., Баландин С.В., Тагаев А.А., Потемкина А.А. принимали участие в проведении экспериментов. Овчинникова Т.В. сформулировала концепцию, обеспечила координацию и финансирование работ, провела анализ экспериментальных данных, осуществила редактирование и подготовку рукописи к публикации.

Окончательный вариант рукописи был утвержден всеми авторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Drider D., Rebuffat S. Prokaryotic Antimicrobial Peptides. From Genes to Applications / Springer. 2011. P. 1–451.
2. Antoshina D.V., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. // Biochemistry (Moscow). 2022. V. 87. P. 1387–1403. <https://doi.org/10.1134/S0006297922110165>
3. Zimina M., Babich O., Prosekov A., Sukhikh S., Ivanova S., Shevchenko M., Noskova S. // Antibiotics (Basel). 2020. V. 9. P. 553–574. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090553>
4. Field D., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01363>
5. Repka L.M., Chekan J.R., Nair S.K., van der Donk W.A. // Chem. Rev. 2017. V. 11. P. 5457–5520. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00591>
6. Ryan M.P., Rea M.C., Hill C., Ross R.P. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 612–619. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.612-619.1996>
7. Navaratna M.A., Sahl H.G., Tagg J.R. // Infect. Immun. 1999. V. 67. P. 4268–4271. <https://doi.org/10.1128/iai.67.8.4268-4271.1999>
8. Holo H., Jeknic Z., Daeschel M., Stevanovic S., Nes I.F. // Microbiology (Reading). 2001. V. 147. P. 643–651. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-3-643>
9. Hyink O., Balakrishnan M., Tagg J.R. // FEMS Microbiol. Lett. 2005. V. 252. P. 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.003>
10. Yonezawa H., Kuramitsu H.K. // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. V. 49. P. 541–548. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.541-548.2005>
11. Begley M., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 5451–5460. <https://doi.org/10.1128/aem.00730-09>
12. Shenkarev Z.O., Finkina E.I., Nurmukhamedova E.K., Balandin S.V., Mineev K.S., Nadezhdin K.D., Yakimenko Z.A., Tagaev A.A., Temirov Y.V., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. // Biochem. 2010. V. 49. P. 6462–6472. <https://doi.org/10.1021/bi100871b>
13. Barbosa J.C., Gonçalves S., Makowski M., Silva Í.C., Caetano T., Schneider T., Mösker E., Süßmuth R.D., Santos N.C., Mendo S. // Coll. Surf. B Biointerfaces. 2022. V. 211. P. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112308>
14. Panina I.S., Balandin S.V., Tsarev A.V., Chugunov A.O., Tagaev A.A., Finkina E.I., Antoshina D.V., Sheremeteva E.V., Paramonov A.S., Rickmeyer J., Bierbaum G., Efremov R.G., Shenkarev Z.O., Ovchinnikova T.V. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 1332. <https://doi.org/10.3390/ijms24021332>
15. McClerren A.L., Cooper L.E., Quan C., Thomas P.M., Kelleher N.L., van der Donk W.A. // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2006. V. 103. P. 17243–17248. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606088103>
16. Sawa N., Wilaipun P., Kinoshita S., Zendo T., Leela-watcharamas V., Nakayama J., Sonomoto K. // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 900–903. <https://doi.org/10.1128/aem.06497-11>
17. Zhao X., van der Donk W.A. // Cell Chem. Biol. 2016. V. 23. P. 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.11.014>
18. Huo L., van der Donk W.A. // J. Am. Chem. Soc. 2016. V. 138. P. 5254–5257. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b02513>
19. Xin B., Zheng J., Liu H., Li J., Ruan L., Peng D., Sajid M., Sun M. // Front Microbiol. 2016. V. 7. P. 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01115>
20. Collins F.W.J., O'Connor P.M., O'Sullivan O., Rea M.C., Hill C., Ross R.P. // Microbiology (Reading). 2016. V. 162. P. 1662–1671. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000340>
21. Singh M., Chaudhary S., Sareen D. // Mol. Microbiol. 2020. V. 113. P. 326–337. <https://doi.org/10.1111/mmi.14419>
22. Caetano T., Krawczyk J.M., Mösker E., Süßmuth R.D., Mendo S. // Chem. Biol. 2011. V. 18. P. 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.11.010>
23. Caetano T., Barbosa J., Mösker E., Süßmuth R.D., Mendo S. // Res Microbiol. 2014. V. 165. P. 600–604. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.006>
24. Jones D.H., Howard B.H. // BioTechniques. 1991. V. 10. P. 62–66.

Biotechnological Production of the Recombinant Two-Component Lantibiotic Lichenicidin in the Bacterial Expression System

D. V. Antoshina*, S. V. Balandin*, **, A. A. Tagaev*,
A. A. Potemkina*, **, and T. V. Ovchinnikova*, **, #

Phone: +7 (495) 336-44-44; e-mail: ovch@ibch.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences ,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** Phystech School of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology
(National Research University),
Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, 141700 Russia

Lantibiotics are a family of bacterial antimicrobial peptides synthesized by ribosomes that undergo post-translational modification to form lanthionine (Lan) and methyllanthionine (MeLan) residues. Lantibiotics are considered promising agents for combating antibiotic-resistant bacterial infections. This paper presents a biotechnological method for obtaining two components of the lantibiotic lichenicidin from *Bacillus licheniformis* B-511 – Lch α and Lch β . A system has been developed that allows co-expression of the lchA1 or lchA2 genes, encoding the precursors of the α - or β -components, respectively, with the lchM1 or lchM2 genes of the modifying enzymes LchM1 and LchM2 in *Escherichia coli* cells. The developed system of heterologous expression and purification made it possible to obtain, with high yield, post-translationally modified recombinant Lch β , completely identical to the natural peptide in structure and biological activity.

Keywords: antibiotics, antimicrobial peptides, bacteriocins, lantibiotics, recombinant peptides, biotechnology



УДК 557.112.5:557.112.6

ПРОИЗВОДНОЕ НЕЙРОТОКСИНА ВеМ9 РАСКРЫВАЕТ ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ИЗОФОРМОЙ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ Na_v1.5

© 2024 г. М. А. Черных*, М. А. Дюжева*, **, Н. А. Кульдюшев*, С. Пеньёр***,
А. А. Беркут*, Я. Титгат***, А. А. Василевский*, #, А. О. Чугунов*

* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
Россия, 125047 Москва, Миусская площадь, 9

*** Лёвенский университет, ON II, Herestraat 49, box 922, 3000, Лёвен, Бельгия

Поступила в редакцию 02.12.2023 г.

После доработки 09.12.2023 г.

Принята к публикации 10.12.2023 г.

α -Нейротоксины скорпионов – классические лиганды потенциал-чувствительных натриевых каналов, ингибирующие их инактивацию. Сила этого эффекта зависит от организма и изоформы каналов, а точные механизмы, объясняющие различия в активности, пока еще не известны. Ранее мы показали, что α -токсинам скорпионов свойственно модульное строение. Они состоят из консервативного, структурно устойчивого сердцевинного модуля и лабильного модуля специфичности, который обладает высокой вариабельностью и определяет селективность в отношении разных каналов. При этом у токсинов, предпочтительно воздействующих на каналы млекопитающих (“млекотоксинов”), мы отметили более высокую подвижность модуля специфичности по сравнению с инсектотоксинами, высокоактивными в отношении насекомых. Мы предположили, что эта подвижность у млекотоксинов увеличена благодаря двум консервативным остаткам глицина, ограничивающим N-концевую петлю модуля специфичности. Для проверки этого предположения мы получили производное нейротоксина ВеМ9 из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus* с двумя заменами аминокислотных остатков в соответствующих позициях на глицин (A4G и Y17G). Неожиданно оказалось, что полученный нами полипептид ВеМ9^{GG} утратил активность в отношении изоформы каналов Na_v1.5, характерной для сердечной мускулатуры млекопитающих. Сравнение двух известных структур комплексов потенциал-чувствительных натриевых каналов с токсинами скорпионов позволило объяснить наблюдаемый эффект. Мы предполагаем существенную роль мембраны во взаимодействии токсинов с изоформой Na_v1.5.

Ключевые слова: нейротоксины, натриевые каналы, белковая инженерия, молекулярная динамика

DOI: 10.31857/S0132342324040095, **EDN:** MWRFGB

ВВЕДЕНИЕ

Изучение потенциал-чувствительных натриевых каналов (Na_v) важно как для фундаментальной биологии, так и для фармакологии, поскольку они отвечают за формирование потенциала действия

и тем самым обеспечивают работу электровозбудимых клеток: нейронов и миоцитов. Главная α -субъединица Na_v – это трансмембранный псевдотетрамер из четырех гомологичных, но различающихся повторов (D I–IV) в составе единой полипептидной цепи длиной ~2000 а.о. В каждом повторе

Сокращения: МД – молекулярная динамика; ПД – поровый домен; ПЧД – потенциал-чувствительный домен; ВеМ9 – α -подобный нейротоксин М9 из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*; ВеМ9^{GG} – производное нейротоксина с двумя заменами аминокислотных остатков в соответствующих позициях на глицин (A4G и Y17G); Na_v – потенциал-чувствительные натриевые каналы; VgNa_v1 – Na_v таракана; α -NaTx – α -нейротоксины скорпионов; Ttx – тиредоксин.

Автор для связи: (эл. почта: avas@ibch.ru).

можно выделить потенциал-чувствительный домен (ПЧД, трансмембранные спирали S1–S4), запускающий конформационные перестройки в ответ на сдвиг мембранного потенциала. При этом непосредственным сенсором потенциала служит сегмент S4, содержащий регулярно расположенные положительно заряженные остатки и переходящий при деполяризации мембраны из положения “вниз”, соответствующего неактивированному каналу, в положение “вверх” при активации. Спираль S5 и S6 из всех четырех повторов формируют единый поровый домен (ПД), способный селективно пропускать ионы натрия. Активация ПЧД I–III приводит к открытию ПД, а ПЧД IV отвечает за быструю инактивацию канала, во время которой ПД снова перестает пропускать Na^+ [1, 2].

В то время как у большинства насекомых имеется лишь один ген, кодирующий Na_v , у млеко-

питающих их несколько, а соответствующие изоформы белка называются $\text{Na}_v1.1$ – 1.9 . Поскольку Na_v крайне важны для работы нервной системы и мышц, они служат мишенью для множества нейротоксинов, связывающихся с Na_v и имеющими изоформ-зависимую активность. Так, один из важнейших компонентов яда скорпионов – так называемые “ α -токсины” (α - NaTx) – селективно связываются с ПЧД IV и ингибируют инактивацию канала. Это небольшие белки, состоящие из ~65 а.о., их укладка представлена β -листом из трех β -тяжей, короткой α -спиралью и стабилизирована четырьмя S–S-мостиками. Некоторые α - NaTx действуют преимущественно на каналы насекомых (инсектотоксины), другие активны на разных изоформах каналов млекопитающих (млекотоксины), а третьи характеризуются широким профилем активности (α -подобные токсины). На рис. 1 приведены аминокислотные

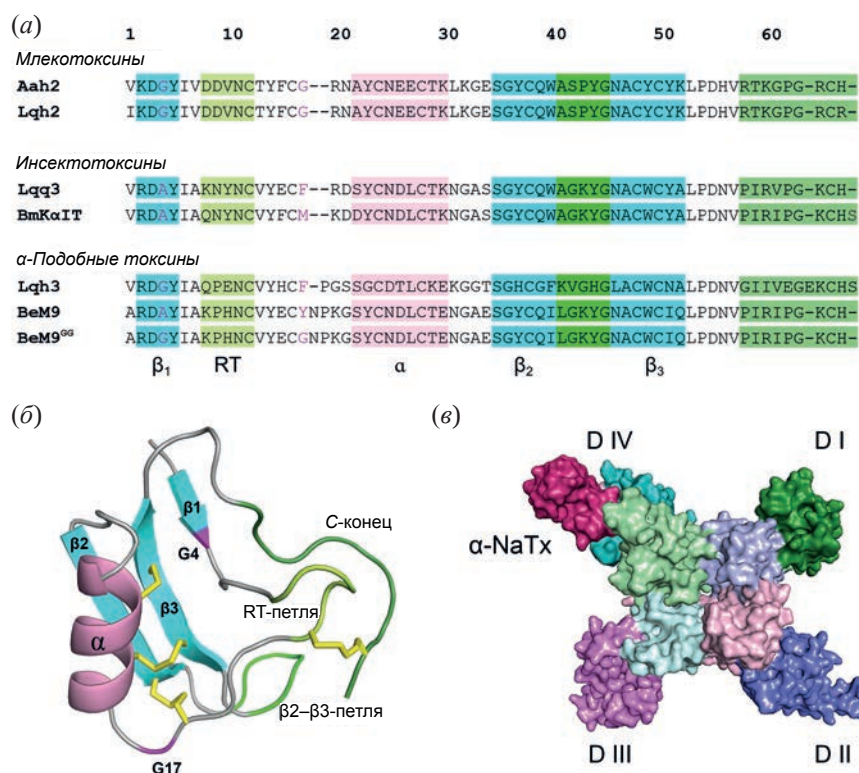


Рис. 1. Структурные особенности α - NaTx . (а) – Сравнение аминокислотных последовательностей представителей разных групп α - NaTx . Розовым обозначена α -спираль, голубым – β -тяжи, оттенками зеленого – различные участки модуля специфичности: светлый – RT-петля, темнее – β_2 – β_3 -петля, темный – С-концевая область. Малиновым выделены “шарнирные” глицины (остатки 4 и 17 по нумерации Aah2); (б) – пространственная организация α - NaTx на примере млекотоксина Aah2. Цветовые обозначения аналогичны панели (а). Желтым показаны дисульфидные мостики; (в) – общий вид взаимодействия α - NaTx с натриевыми каналами на примере комплекса Lqh3– $\text{hNa}_v1.5$ [7]. Na_v изображен цветной поверхностью с индивидуально раскрашенными гомологичными повторами D I–IV (ПД более блеклый, ПЧД – яркий). Бордовым показан Lqh3.

последовательности нескольких α -NaTx, относящихся к трем группам (а), и общая укладка этих токсинов (б). Некоторые млекотоксины селективны в отношении отдельных изоформ Na_v : к примеру, MeuNaTx α -2 селективен к Na_v 1.4 [3], а OD1 – к Na_v 1.7 [4].

Несмотря на большой массив данных, до сих пор не ясно, как управлять селективностью α -NaTx, получая с помощью рационального дизайна производные токсинов с заданными свойствами – молекулярные зонды для исследований нервной системы и прототипы лекарств. Ранее мы показали наличие у α -NaTx модульной структуры, в которой к жесткой основе – так называемому “сердцевинному” модулю – прикрепляется “модуль специфичности”, отвечающий за селективное узнавание конкретной изоформы Na_v и состоящий из N-концевой RT-петли, β_2 – β_3 -петли и C-концевой области, соединенной с RT-петлей дисульфидной связью (рис. 1б) [5]. Последовавшее определение структуры комплексов Na_v с α -NaTx (рис. 1в) подтвердило, что взаимодействует с каналом именно модуль специфичности [6, 7].

Расчеты молекулярной динамики (МД) и анализ гидрофобных свойств выявили, что модуль специфичности млекотоксинов более подвижный и гидрофильный в сравнении с токсинами, активными в отношении Na_v насекомых. В той же работе мы указали, что более высокая подвижность всего модуля может быть обусловлена парой консервативных для млекотоксинов остатков глицина (G4 и G17, нумерация по Aah2, отмечены малиновым цветом на рис. 1), выступающих для RT-петли подобно шарниру. *In silico* мутагенез этой пары остатков показал снижение подвижности, а встречная замена на глицин в структуре инсексикотоксина, напротив, ее повышала, позволив предложить направление дизайна специфических вариантов α -NaTx.

На основе представления о модульном строении α -NaTx мы продолжаем серию работ по мутагенезу одного из наиболее изученных α -подобных токсинов M9 (ВеМ9) из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus* [8]. Ранее специфичность ВеМ9 удалось изменить, получив селективный инсексикотоксин [9]. С целью получения селективных млекотоксинов мы синтезировали производное ВеМ9 с введением указанных выше “шарнирных”

глицинов: A4G и Y17G (ВеМ9^{GG}) и изучили его активность. Неожиданная специфическая утрата активности ВеМ9^{GG} в отношении Na_v 1.5 и нюансы строения комплекса α -NaTx с этой изоформой позволили нам предположить особую роль мембраны.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн и получение ВеМ9^{GG}. Анализ аминокислотных последовательностей α -NaTx (рис. 1) показывает, что у млекотоксинов RT-петля чаще всего ограничена двумя консервативными остатками глицина, предположительно придающими ей более высокую подвижность. Это G4 в β_1 -тяже и G17 сразу после второго остатка цистеина и перед α -спиралью. У α -подобного токсина ВеМ9 в аналогичных позициях расположены остатки A4 и Y17. Мы предположили, что замена обоих этих остатков на глицин увеличит подвижность RT-петли и всего модуля специфичности, уменьшив сродство к Na_v насекомых и сдвинув профиль специфичности в сторону млекотоксинов [5].

ДНК, кодирующую ВеМ9 с заменами A4G и Y17G (ВеМ9^{GG}), синтезировали с помощью ПЦР из перекрывающихся олигонуклеотидов, после чего клонировали в составе бактериального экспрессионного вектора с целью получения рекомбинантного продукта. Мы использовали традиционный подход к получению дисульфидбогатых полипептидов: ВеМ9^{GG} был наработан в составе гибридного белка с тиоредоксином (Trx), необходимым для корректного формирования дисульфидных связей. Trx-ВеМ9^{GG} получили в бактериальной системе и выделили с помощью аффинной хроматографии, после чего целевой продукт отделили от Trx с использованием бромциана. Хроматографической чистоты > 95% достигали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Выход составил 2 мг с 1 л среды LB. Очищенный образец характеризовали с помощью MALDI масс-спектрометрии: измеренная средняя молекулярная масса ВеМ9^{GG} составила 7215.2 Да (расчетное значение 7215.1 Да).

Активность ВеМ9^{GG} в отношении Na_v . Эффекты ВеМ9^{GG} были изучены в сравнении с исходным токсином в концентрации 1 мкМ в отношении ряда Na_v . Мы применили стандартный

подход, подразумевающий экспрессию генов каналов (α -субъединиц и соответствующих вспомогательных β -субъединиц) в ооцитах *Xenopus laevis*. Мы оценили активность ВеМ9^{GG} на четырех изоформах Na_v млекопитающих (rNa_v1.2, rNa_v1.4, hNa_v1.5 и mNa_v1.6) и в отношении канала таракана BgNa_v1 (табл. 1). Активность ВеМ9^{GG} оказалась снижена по сравнению с исходным токсином, при этом в отношении Na_v1.5 в концентрации 1 мкМ активность не наблюдалась вовсе.

Модель комплекса α -NaTx–Na_v подсказывает причину утраты активности ВеМ9^{GG} на Na_v1.5. Для того чтобы объяснить наблюдаемый эффект, мы обратились к известным структурам комплексов Na_v с токсинами, построили модели комплексов с ВеМ9 и провели МД. В 2019 г. методом криоэлектронной микроскопии была получена первая структура комплекса химерного Na_v (ПЧД IV от hNa_v1.7, каркас от канала таракана Na_vPas) с млеко-

токсином Aah2 (PDB ID: 6NT4) [6]. Эта структура наглядно подтвердила нашу гипотезу модульного строения α -NaTx: модуль специфичности токсина и оказался той частью, которая связывается с Na_v: RT-петля направлена в сторону ПД I, β_2 – β_3 -петля – в сторону спиралей S2 и S3 ПЧД IV, а С-конец – в сторону ПД I и петли S3–S4 ПЧД IV; остальная часть токсина (сердцевинный модуль) с каналом не взаимодействует (рис. 1в, 2а).

В 2021 г. была получена еще одна структура – комплекса α -подобного токсина Lqh3 с Na_v1.5 человека (PDB ID: 7K18; рис. 2б) [7]. В общем похожая, в деталях она заметно отличается от комплекса Aah2–Na_v1.7: в ней модуль специфичности не дотягивается до ПД I и S4 ПЧД IV, а сам токсин глубже погружается в “ложбину” между спиральями S2 и S3 ПЧД IV, вероятно активно взаимодействуя при этом с мембраной сердцевинным модулем (а именно N-концевой частью α -спирали). Возможно, это связано с тем, что в спирали S2 ПЧД IV

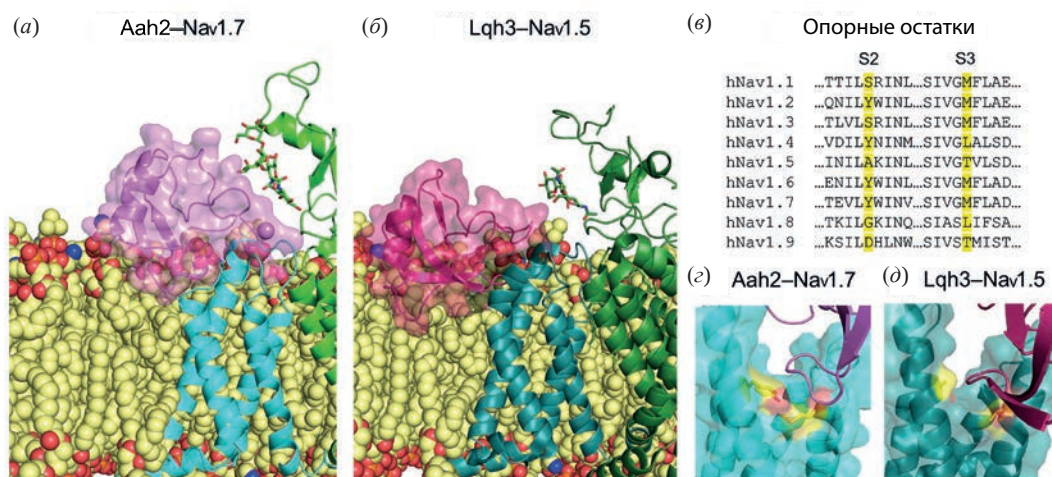


Рис. 2. Различия структуры комплексов Na_v с α -NaTx. (а, б) – Сайт связывания α -NaTx с Na_v в мембране. Голубым выделен ПЧД IV канала, зеленым – ПД I (виден гликан), розовым и малиновым показаны токсины; (в) – сравнение фрагментов аминокислотных последовательностей S2 и S3 ПЧД IV. Желтым выделены так называемые “опорные” остатки, определяющие характер посадки β_2 – β_3 -петли α -NaTx; (г, д) – посадка β_2 – β_3 -петли α -NaTx на “опорные” остатки S2–S3 ПЧД IV. Цветовые обозначения аналогичны панелям (а, б), желтым показаны “опорные” остатки.

Таблица 1. Активность ВеМ9 и ВеМ9^{GG} в отношении Na_v

Токсин	rNa _v 1.2	rNa _v 1.4	hNa _v 1.5	mNa _v 1.6	BgNa _v 1
ВеМ9	Н/а (3)	0.23 ± 0.03 (4)	0.46 ± 0.03 (3)	0.60 ± 0.04 (8)	1.93 ± 0.05 (7)
ВеМ9 ^{GG}	Н/а (4)	0.07 ± 0.01 (3)	Н/а (2)	0.17 ± 0.04 (4)	0.52 ± 0.01 (2)

Примечание: для каналов млекопитающих первая буква означает организм: r – крыса, h – человек, m – мышь. Н/а – нет активности. Указаны значения $I_{30\text{ мс}}/I_{\text{peak}}$ или $I_{5\text{ мс}}/I_{\text{peak}}$ (для Na_v1.5; см. пояснения в “Эксперим. части”). Приведены средние значения ± стандартные отклонения, в скобках указано число независимых экспериментов (*n*).

у $\text{Na}_v1.5$ остаток, формирующий “опору” для петли $\beta_2\text{--}\beta_3$, намного меньше (аланин), чем в ряде других каналов (обычно тирозин; рис. 2в). В результате токсин садится глубже между S2 и S3 (рис. 2г, д), предположительно более интенсивно при этом взаимодействуя с мембраной. Мы предполагаем, что различия в структуре комплексов Aah2– $\text{Na}_v1.7$ и Lqh3– $\text{Na}_v1.5$ смогут указать причину потери активности BeM9^{GG} в отношении h $\text{Na}_v1.5$.

Lqh3, активный в отношении $\text{Na}_v1.5$, имеет G4, как и BeM9^{GG}, однако при этом в 17-м положении у него расположен ароматический остаток, как у нативного BeM9 (рис. 1а). Согласно структуре комплекса Lqh3– $\text{Na}_v1.5$ (PDB ID: 7K18), F17 у Lqh3 глубоко погружен в мембрану (рис. 2б). Сродство этого остатка к мембране может быть важно именно в случае h $\text{Na}_v1.5$ ввиду особой посадки токсина в ложбине между S2 и S3. В этом случае потеря гидрофобного остатка (замена Y17G) снижает сродство к мембране и не позволяет сформировать высокоаффинный комплекс (рис. 3).

Мы собрали данные по активности различных токсинов в отношении $\text{Na}_v1.5$, чтобы проиллюстрировать нашу гипотезу о важности их взаимодействия с мембраной (табл. 2). В большинстве случаев выраженная активность в отношении $\text{Na}_v1.5$ у $\alpha\text{-NaTx}$ коррелирует с наличием в 17-й позиции гидрофобного остатка.

К наиболее важным контрпримерам отнесем Lqh2, MeuNaTx α -4 и токсины из рода скорпионов *Tityus*. Lqh2, несмотря на сравнительно высокую активность, все же более активен на каналах $\text{Na}_v1.2$ и 1.4 [12]. MeuNaTx α -4 вообще не активен на каналах млекопитающих, что, вероятно, связано с другими отличиями его структуры. Токсины Ts2–5 сильно отличаются от классических $\alpha\text{-NaTx}$ из-за короткой $\beta_2\text{--}\beta_3$ -петли, поэтому к ним общая модель связывания не применима.

Для более основательной проверки гипотезы роли взаимодействия $\alpha\text{-NaTx}$ с мембраной (посредством остатков в позициях 17, 41 и, возможно, других) в связывании с $\text{Na}_v1.5$ потребуются дополнительные эксперименты. Среди таких экспериментов можно назвать получение следующих производных: 1) BeM9^{Y17G} с единичной заменой (должен потерять аффинность к $\text{Na}_v1.5$); 2) Lqh2^{G17F/Y} (взаимодействие должно усилиться); 3) Lqh3^{F17G} (взаимодействие должно ослабнуть). Кроме того, необходимо проведение МД моделей комплексов $\alpha\text{-NaTx}$ – $\text{Na}_v1.5$ в явно заданной липидной мембране для детальной характеристики взаимодействий токсина с каналом и мембраной.

Помимо этого выявленное отличие в строении “ложбины” между S2 и S3 в ПЧД IV различных Na_v (рис. 2в–д) позволяет предсказать различный способ взаимодействия токсинов с каналами млекопитающих: с $\text{Na}_v1.7$, а также $\text{Na}_v1.2$, 1.4 и 1.6 (тирозин в “ложбине”) токсин будет рас-

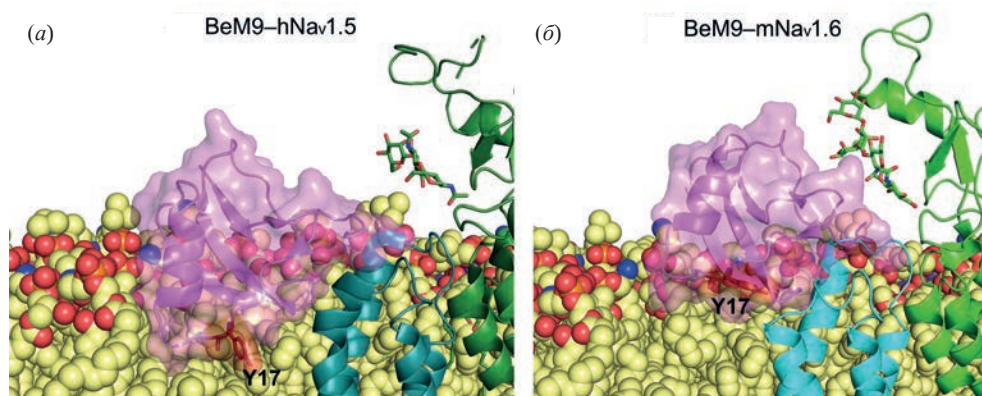


Рис. 3. Влияние мутации Y17G на связывание BeM9 с Na_v . Голубым выделен ПЧД IV канала, зеленым – ПД I, розовым – токсин BeM9, темно-красным показан остаток Y17, направленный в сторону мембраны у BeM9 и замещенный на глицин у BeM9^{GG}. (а) – Модель комплекса BeM9–h $\text{Na}_v1.5$, полученная пространственным совмещением с Lqh3 из комплекса 7K18. Видно, что остаток Y17 у BeM9 заглублен в мембрану; (б) – модель комплекса BeM9–m $\text{Na}_v1.6$ (построение модели см. в “Эксперим. части”).

Таблица 2. Активность α -NaTx в отношении Na_v1.5

Токсин	Активность	Остаток 17	Комментарии
ВеМ9	Активен при 1 мкМ [5]	Y	–
ВеМ9 ^{GG}	Не активен при 1 мкМ	G	–
ВеМ9 ^E	Активен при 1 мкМ [9]	Y	Активность слабая, но в отношении других каналов млекопитающих упала сильнее
ВеМ9 ^{EG}	Не активен при 1 мкМ [9]	G	–
msВеМ9	Не активен при 1 мкМ [10]	G	–
Lqh2	EC ₅₀ = 11.5 нМ [11]	G	На порядок более активен в отношении других каналов [12]
Lqh3	EC ₅₀ = 2.5 нМ [11]	F	–
Lqh6	Активен при 1 мкМ [13]	I	–
Lqh7	Активен при 1 мкМ [13]	F	–
LqhaIT	EC ₅₀ = 32.9 нМ [11]	F	Инсектотоксин
MeuNaTx α -1	Не активен при 1 мкМ [3]	G	–
MeuNaTx α -2	Не активен при 1 мкМ [3]	A	–
MeuNaTx α -4	Не активен при 2 мкМ [3]	F	Инсектотоксин
MeuNaTx α -5	Активен при 2 мкМ [3]	F	–
MeuNaTx α -12	Не активен при 10 мкМ [14]	A	–
MeuNaTx α -13	Не активен при 10 мкМ [14]	F	Отличается последовательность β_2 – β_3
BmK M1	EC ₅₀ = 195 нМ [15]	A	–
OD1	Активен при 4 мкМ [4]	A	–
Ts2	Активен при 1 мкМ [16]	F	Короткая β_2 – β_3 -петля, вероятно, другой паттерн связывания
Ts3	Не активен при 500 нМ [17]	F	
Ts4	Не активен при 500 нМ [18]	F	
Ts5	Активен при 1 мкМ [19]	F	

Примечание: EC₅₀ – полумаксимальная эффективная концентрация, означает концентрацию лиганда, которая вызывает эффект, равный половине максимального возможного для этого лиганда. В данном случае подразумевается ингибирование инактивации.

полагаться “выше” (как на рис. 2б), слабее взаимодействуя – с мембраной; а с Na_v1.5, а также Na_v1.1, 1.3, 1.8 и 1.9 (“ложбина” образована остатками S, A, G или D) токсин получает возможность опуститься “ниже” в ПЧД, одновременно слабее взаимодействуя с ним и сильнее – с мембраной. Наличие заряженного остатка аспарагиновой кислоты у Na_v1.9 открывает дополнительные перспективы по созданию действующих на эту изоформу полипептидов, несущих положительный заряд.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение рекомбинантных производных ВеМ9. Синтез нуклеотидной последователь-

ности, кодирующей ВеМ9^{GG}, проведен с помощью лигирования олигонуклеотидных фрагментов (табл. 3) и ПЦР аналогично описанной ранее процедуре [5, 20]. Полученную полноразмерную последовательность клонировали в составе экспрессионного вектора pET-32b (Novagen, США; вставка по сайтам рестрикции KpnI и BamHI). В результате в составе вектора pET-32b-ВеМ9^{GG} имеется химерный ген гибридного белка Trx-ВеМ9^{GG}.

Экспрессию химерных генов проводили в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3) [21]. Культуру бактерий, трансформированных с использованием экспрессионного вектора, выращивали на среде LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) при

Таблица 3. Олигонуклеотиды для синтеза гена BeM9^{GG}

Название	Последовательность
M9 ^{GG} f1	ATATGGTACCATGGCTCGTGACGGTTACATCGCA
M9 ^{GG} f2	AACCGCACAACTGCGTTTACGAATGCGGCAACCCGAAAGGTTCTT
M9f3	ACTGCAACGACCTGTGCACCGAAAACGGTGCTGAATCTGGTTACT
M9f4	GCCAGATCCTGGGTAAATACGGTAACGCTTGCTGGTGCATCCA
M9f5	GCTGCCGGACAACGTTCCGATCCGTATCCCGGGTAAATGCC
M9 ^{GG} r1/2	AAACGCAGTTGTGCGGTTTAGCGATGTAACCGTCAC
M9 ^{GG} r2/3	TGCACAGGTCGTTGCAGTAAGAACCTTTCGGGTTGC
M9r3/4	ATTTACCCAGGATCTGGCAGTAACCAGATTACAGCAC
M9r4/5	GAACGTTGTCCGGCAGCTGGATGCACCAGCAAGC
M9r	GCATGGATCCCCTAGTGGCATTACCCGGGATAC

Примечание: полужирным шрифтом выделены старт- и стоп-кодоны, подчеркнуты сайты рестрикции для последующей вставки в плазмиду.

37°C и интенсивном перемешивании до достижения средней логарифмической фазы. Индукцию экспрессии целевого гена осуществляли добавлением в среду 0.2 мМ изопропил-β-D-1-тио-галактопиранозид, после чего культуру инкубировали еще 4 ч. По истечении этого времени бактерии осаждали, ресуспендировали в стартовом буфере для аффинной хроматографии (300 мМ NaCl, 20 мМ Tris-HCl, pH 7.5) и лизировали с помощью ультразвука.

Слитные белки имели в своем составе гексагистидиновую последовательность, которая позволяла проводить их очистку с помощью металл-хелатной хроматографии [22] на сорбенте TALON Superflow Metal Affinity Resin (Clontech, США). Элюцию сорбированных белков проводили буфером, содержащим имидазол (150 мМ имидазол, 300 мМ NaCl, 20 мМ Tris-HCl, pH 7.5). BeM9^{GG} не содержит остатков метионина, поэтому целевой полипептид отщепляли от Trx с помощью бромциана по описанной методике [23]. Для этого в последовательность химерного гена был специально введен метиониновый кодон непосредственно перед геном токсина. Очистку от нецелевых продуктов реакции проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ, как описано для BeM9 [5].

Масс-спектрометрия. Полипептиды анализировали с помощью времяпролетной MALDI масс-спектрометрии. Использовали спектрометр

Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonik, Германия), анализ проводили как описано ранее [24]. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (Sigma-Aldrich, США). Измерения проводили в линейном режиме. Масс-спектры анализировали с помощью программного обеспечения Data Analysis 4.3 (Bruker, Германия).

Электрофизиология. Активность полученного производного сравнивали с исходным токсином BeM9 по эффекту в отношении Na_v, экспрессированных в ооцитах лягушки *X. laevis*. Выделение ооцитов, получение РНК, а также сбор и анализ данных проводили, как описано ранее [5, 10]. Использовали гены ряда изоформ Na_v млекопитающих (Na_v1.2 и 1.4 крысы (r), Na_v1.5 человека (h), Na_v1.6 мыши (m), вспомогательных субъединиц β 1 и β 1), а также α-субъединицы BgNa_v1 и вспомогательной субъединицы TipE таракана *Blattella germanica* и дрозофилы соответственно. Для оценки эффективности токсинов мы использовали величину, равную отношению регистрируемого тока через мембрану ооцита спустя 30 мс после подачи тестового импульса к пиковому току ($I_{30\text{ мс}}/I_{\text{peak}}$). В случае канала Na_v1.5 из-за особой кинетики его работы использовали отношение тока через 5 мс после тестового импульса к пиковому току ($I_{5\text{ мс}}/I_{\text{peak}}$). Все данные анализировали с помощью программного обеспечения pClamp Clampfit версии 10.4 (Molecular

Devices, США) и Origin Pro версии 8.0 (OriginLab, США).

Молекулярное моделирование. Внутримолекулярные эффекты от замен в структуре ВеМ9 оценивали с помощью сравнительного моделирования токсина дикого типа (PDB ID: 5MOU) и его производного. Модель ВеМ9^{GG} была получена с помощью моделирования по гомологии в программе MODELLER v. 9.19 [25]. Три лучшие модели из 20 по внутренней оценке программы использовали как стартовые конформации для проведения трех реплик МД, а для нативного ВеМ9 – первую из ЯМР-ансамбля конформаций также в трех независимых запусках МД.

Для МД использовали программу GROMACS 5.1.2 [26] и силовое поле Amber99sb-ildn.ff [27]. Радиус отсечки ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий составил 10 и 12 Å соответственно. Для МД построили кубические ячейки ($55 \times 55 \times 55 \text{ Å}^3$ для токсинов и $120 \times 120 \times 120 \text{ Å}^3$ для комплексов) с моделью воды SPC [28], содержащие противоионы для электронейтральности и уравновешенные по энергии путем нагревания до 300 К в течение 100 пс. МД проводили в периодических граничных условиях при $T = 300 \text{ К}$, $P = 1$ бар, поддерживаемых при помощи термостата V-rescale [29] и баростата Берендсена [30] соответственно. Длина и шаг траектории составили 100 нс и 2 фс соответственно. Для каждой изучаемой молекулы было проведено по три расчета для накопления статистических данных. Для сравнения объектов между собой использовали *t*-критерий Стьюдента.

Для объяснения эффекта мутации Y17G в ВеМ9 строили модели комплексов токсина с Na_v , использованными для измерения токов – $\text{hNa}_v1.5$ и $\text{mNa}_v1.6$. Комплекс ВеМ9– $\text{hNa}_v1.5$ получали прямой заменой токсина Lqh3 на ВеМ9 после пространственного совмещения в структуре 7K18. Модель ВеМ9– $\text{mNa}_v1.6$ строили следующим образом: сначала с использованием метода гомологии и программы MODELLER строили полную модель $\text{mNa}_v1.6$ по структуре канала $\text{hNa}_v1.6$ (PDB ID: 8FHD). Однако, поскольку для $\text{Na}_v1.6$ пока не была определена структура комплекса ни с одним α -NaTx, его ПЧД IV находится в активированном состоянии ввиду отсутствия потенциала (положение S4-сенсора “вверх”). Далее

неактивированное состояние ПЧД IV $\text{mNa}_v1.6$ было смоделировано отдельно по гомологии со структурой комплекса Aah2 с химерой $\text{hNa}_v1.7$ – Na_vPas , S4-сенсор которой в связи с ингибированием токсином Aah2 находится в нужном нам положении “вниз”. На последнем шаге активированный ПЧД IV из первой модели заменяли на неактивированный из второй, после чего структуру релаксировали. Полученная таким образом модель $\text{mNa}_v1.6$ имеет неактивированный S4-сенсор в ПЧД IV, пригодный для моделирования комплексов с α -NaTx. ВеМ9 в этот комплекс помещали путем пространственного совмещения с Aah2 в оригинальной структуре 6NT4, оставляя вместо структуры “химерного” канала полученную модель $\text{mNa}_v1.6$ с неактивированным ПЧД IV.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для проверки гипотезы о важности “шарнирных” глицинов в воздействии α -NaTx на Na_v млекопитающих мы получили производное α -подобного токсина ВеМ9 с заменами A4G и Y17G. Для этого мы использовали бактериальную систему экспрессии и белок-помощник Ttx. Мы оценили активность ВеМ9^{GG} в отношении каналов млекопитающих и насекомого по сравнению с исходным токсином. Вопреки нашим ожиданиям, ВеМ9^{GG} оказался менее активным на каналах млекопитающих и вовсе утратил активность по отношению к изоформе $\text{Na}_v1.5$. Для объяснения такого эффекта мы обратились к компьютерному моделированию. Анализ структуры комплексов Na_v с токсинами позволил предположить вероятный механизм, учитывающий роль мембранного окружения каналов. Наша работа открывает дополнительные возможности рационального дизайна селективных лигандов Na_v , которые могут быть использованы для разработки фармацевтических препаратов и инструментов для изучения нейронов на молекулярном уровне.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00395).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с лягушками проводили в соответствии с принципами ARRIVE (Animal Research:

Reporting of *In Vivo* Experiments) и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (ETS123, Страсбург, 18.III.1986).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jiang D., Zhang J., Xia Z. // *Front Pharmacol.* 2022. V. 13. P. 908867.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.908867>
2. Catterall W.A. // *Channels (Austin)*. 2023. V. 17. P. 2281714.
<https://doi.org/10.1080/19336950.2023.2281714>
3. Zhu S., Peigneur S., Gao B., Lu X., Cao C., Tytgat J. // *Mol. Cell Proteomics*. 2012. V. 11. P. M111.012054.
<https://doi.org/10.1074/mcp.m111.012054>
4. Durek T., Vetter I., Wang C.-I.A., Motin L., Knapp O., Adams D.J., Lewis R.J., Alewood P.F. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. P. 1215–1222.
<https://doi.org/10.1021/cb400012k>
5. Chugunov A.O., Koromyslova A.D., Berkut A.A., Peigneur S., Tytgat J., Polyansky A.A., Pentkovsky V.V., Vassilevski A.A., Grishin E.V., Efremov R.G. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 19014–19027.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m112.431650>
6. Clairfeuille T., Cloake A., Infield D.T., Llongueras J.P., Arthur C.P., Li Z.R., Jian Y., Martin-Eauclaire M.-F., Bougis P.E., Ciferri C., Ahern C.A., Bosmans F., Hacks D.H., Rohou A., Payandeh J. // *Science*. 2019. V. 363. P. eaav8573.
<https://doi.org/10.1126/science.aav8573>
7. Jiang D., Tonggu L., Gamal El-Din T.M., Banh R., Pomès R., Zheng N., Catterall W.A. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 128.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-20078-3>
8. Волкова Т.М., Гарсия А.Ф., Тележинская И.Н., Потапенко Н.А., Гришин Е.В. // *Биоорг. химия*. 1984. Т. 10. С. 979–982.
9. Chernykh M.A., Kuldyushev N.A., Berkut A.A., Efremov R.G., Vassilevski A.A., Chugunov A.O., Peigneur S., Tytgat J. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 854–863.
<https://doi.org/10.1134/S1068162021040063>
10. Kuldyushev N.A., Berkut A.A., Peigneur S., Tytgat J., Grishin E.V., Vassilevski A.A. // *FEBS Lett.* 2017. V. 591. P. 3414–3420.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.12839>
11. Chen H., Heinemann S.H. // *J. Gen. Physiol.* 2001. V. 117. P. 505–518.
<https://doi.org/10.1085/jgp.117.6.505>
12. Chen H., Lu S., Leipold E., Gordon D., Hansel A., Heinemann S.H. // *Eur. J. Neurosci.* 2002. V. 16. P. 767–770.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02142.x>
13. Hamon A., Gilles N., Sautière P., Martinage A., Kopyan C., Ulens C., Tytgat J., Lancelin J.-M., Gordon D. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. P. 3920–3933.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03065.x>
14. Zhu L., Peigneur S., Gao B., Tytgat J., Zhu S. // *Biochimie*. 2013. V. 95. P. 1732–1740.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.05.009>
15. Goudet C., Huys I., Clynen E., Schoofs L., Wang D.C., Waelkens E., Tytgat J. // *FEBS Lett.* 2001. V. 495. P. 61–65.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02365-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02365-1)
16. Cologna C.T., Peigneur S., Rustiguel J.K., Nona-to M.C., Tytgat J., Arantes E.C. // *FEBS J.* 2012. V. 279. P. 1495–1504.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08545.x>
17. Kirsch G.E., Skattebøl A., Possani L.D., Brown A.M. // *J. Gen. Physiol.* 1989. V. 93. P. 67–83.
<https://doi.org/10.1085/jgp.93.1.67>
18. Pucca M.B., Cerni F.A., Peigneur S., Bordon K.C.F., Tytgat J., Arantes E.C. // *Toxins (Basel)*. 2015. V. 7. P. 2534–2550.
<https://doi.org/10.3390/toxins7072534>
19. Pucca M.B., Peigneur S., Cologna C.T., Cerni F.A., Zoccal K.F., Bordon K. de C.F., Faccioli L.H., Tytgat J., Arantes E.C. // *Biochimie*. 2015. V. 115. P. 8–16.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.04.010>
20. Shlyapnikov Y.M., Andreev Y.A., Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Grishin E.V. // *Protein Expr. Purif.* 2008. V. 60. P. 89–95.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.03.011>
21. Studier F.W., Moffatt B.A. // *J. Mol. Biol.* 1986. V. 189. P. 113–130.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
22. Hochuli E., Bannwarth W., Döbeli H., Gentz R., Stüber D. // *Nat. Biotechnol.* 1988. V. 6. P. 1321–1325.
<https://doi.org/10.1038/nbt1188-1321>
23. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Grishin E.V. // *Anal. Biochem.* 2010. V. 407. P. 144–146.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.023>

24. Kuzmenkov A.I., Sachkova M.Y., Kovalchuk S.I., Grishin E.V., Vassilevski A.A. // *Biochem. J.* 2016. V. 473. P. 2495–2506.
<https://doi.org/10.1042/bcj20160436>
25. Webb B., Sali A. // *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 2016. V. 54. P. 5.6.1–5.6.37.
<https://doi.org/10.1002/cpbi.3>
26. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. // *SoftwareX.* 2015. V. 1. P. 19–25.
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
27. Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., Maragakis P., Klepeis J.L., Dror R.O., Shaw D.E. // *Proteins.* 2010. V. 78. P. 1950–1958.
<https://doi.org/10.1002/prot.22711>
28. Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. // *J. Chem. Phys.* 1983. V. 79. P. 926–935.
29. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. // *J. Chem. Phys.* 2007. V. 126. P. 014101.
<https://doi.org/10.1063/1.2408420>
30. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., DiNola A., Haak J.R. // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81. P. 3684–3690.
<https://doi.org/10.1063/1.448118>

Scorpion Neurotoxin BeM9 Derivative Uncovers Unique Interaction Mode with Na_v1.5 Sodium Channel Isoform

M. A. Chernykh*, M. A. Duzheva*, **, N. A. Kuldyushev*, S. Peigneur***, A. A. Berkut*, J. Tytgat***, A. A. Vassilevski*, #, and A. O. Chugunov*

E-mail: avas@ibch.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** D.I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology,
Miusskaya pl. 9, Moscow, 125047 Russia

*** KU Leuven, ON II, Herestraat 49, box 922, 3000, Leuven, Belgium

Scorpion α -neurotoxins are classical ligands of voltage-gated sodium channels that inhibit their inactivation. The strength of this effect depends on the organism and channel isoform, and the precise mechanisms explaining the differences in activity are still unknown. Previously, we have shown that scorpion α -toxins are characterized by a modular structure. They consist of a conserved and structurally stable core module and a variable and mobile specificity module, which determines the selectivity for different channels. We noted a higher mobility of the specificity module in toxins active against mammals compared to insect-active toxins. We then hypothesized that the enhanced mobility in mammal toxins was provided by two conserved glycine residues that enclose the *N*-terminal loop of the specificity module. To test this assumption, we obtained a derivative of the neurotoxin BeM9 from the venom of the scorpion *Mesobuthus eupeus* with two replacements of amino acid residues in the corresponding positions with glycine (A4G and Y17G). Unexpectedly, it turned out that BeM9^{GG} lost its activity against Na_v1.5 channel isoform, characteristic of mammalian cardiac muscle. A comparison of two known structures of voltage-gated sodium channel complexes with scorpion toxins made it possible to explain the observed effect. We hypothesize an essential role of the membrane in the interaction of toxins with the Na_v1.5 isoform.

Keywords: neurotoxins, voltage-gated sodium channels, protein engineering, molecular dynamics



УДК 577.34

СВЕРХБЫСТРАЯ ФОТОХИМИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ РОДОПСИНА *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) ПРИ ЩЕЛОЧНОМ ЗНАЧЕНИИ pH

© 2024 г. О. А. Смитиенко^{*, #}, Т. Б. Фельдман^{*, **}, Л. Е. Петровская^{***},
Е. А. Крюкова^{*, ***}, И. В. Шелаев^{****}, Ф. Е. Гостев^{****}, Д. А. Черепанов^{****},
И. Б. Кольчугина^{**}, Д. А. Долгих^{*, **, ***}, В. А. Надточенко^{****},
М. П. Кирпичников^{*, **}, М. А. Островский^{*, **}

^{*} Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
Россия, 119334 Москва, ул. Косыгина, 4

^{**} Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

^{***} ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

^{****} ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
Россия, 119991 Москва, ул. Косыгина, 4

Поступила в редакцию 02.12.2023 г.

После доработки 08.12.2023 г.

Принята к публикации 09.12.2023 г.

Родопсин зубактерии *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) выполняет функцию светозависимого протонного транспорта. В основе работы ESR лежит сверхбыстрая фотохимическая реакция изомеризации ретинального хромофора, которая запускает темновые процессы, замкнутые в фотоцикл. Многие параметры фотоцикла определяются степенью протонирования первичного противоиона хромофорной группы и акцептора протона Asp85. ESR в мицеллах детергента наиболее эффективно прокачивает протоны при pH > 9, когда Asp85 почти полностью депротонирован. В настоящей работе методом фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии была исследована фотохимическая реакция ESR при pH 9.5. Показано, что фотоизомеризация хромофорной группы протекает за 0.51 пс, а вклад реакционного возбужденного состояния составляет ~80%. Сравнение с данными, полученными нами ранее при pH 7.4, показало, что при pH 9.5 реакция протекает значительно быстрее и эффективнее. Это подтверждает важную роль степени протонирования противоиона хромофорной группы в фотоактивируемых процессах родопсинов.

Ключевые слова: родопсины, ретиналь, фотохимия, фемтосекундная спектроскопия

DOI: 10.31857/S0132342324040107, **EDN:** MWPPND

Сокращения: RPSB – протонированное основание Шиффа ретиналя (retinal protonated Schiff base); ESR – родопсин зубактерии *Exiguobacterium sibiricum*; ESA – поглощение из возбужденного состояния (excited state absorption); SE – вынужденное испускание (stimulated emission); GSB – выцветание основного состояния (ground state bleaching); PA – поглощение продукта фотореакции (product absorption); волновой пакет – набор когерентных возбужденных колебательных состояний; ППЭ – поверхность потенциальной энергии; FC – франк-кондоновское (Frank–Condon) состояние; CI – коническое пересечение поверхностей потенциальной энергии (conical intersection); HOOP – внеплоскостные колебания атомов водорода (hydrogen-out-of-plane).

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (926) 470-77-17; эл. почта: djolia@gmail.com).

ВВЕДЕНИЕ

В родопсинах I типа (микробных родопсинах) хромофорная группа – протонированное основание Шиффа ретиналя (RPSB) – под действием света изомеризуется из полностью *транс*- в 13-*цис*-форму [1]. Параметры этой фотохимической реакции существенно зависят от ближайшего белкового окружения. Один из основных факторов – отрицательно заряженный первичный противоион и акцептор протона, координирующий положительный заряд RPSB. В родопсине почвенной эубактерии *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) эту функцию выполняет консервативный остаток Asp85, который, благодаря влиянию остатка His57, имеет сложную кривую титрования с pK_a 2.3, 6.0 и 9.1 (в мицеллах детергента *n*-додецил- β -D-мальтопиранозида (DDM)) [2, 3]. Такой аспартагистидиновый комплекс характерен для протеродопсинов – наиболее распространенной группы микробных родопсинов, в которую также входит и ESR. В работах [2–6] было показано, что максимум поглощения ESR и параметры его фотоцикла (рис. 1) в субнано-миллисекундном временном диапазоне коррелируют с верхним значением pK_a Asp85-His57. При pH выше этого значения, когда Asp85 и His57 полностью депротонированы, протоны прокачиваются наиболее эффективно.

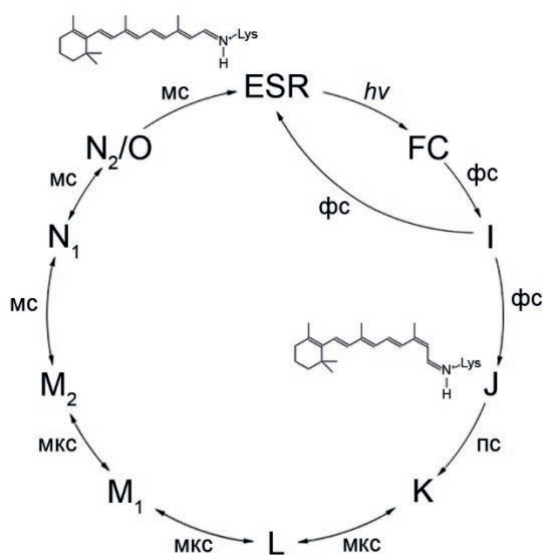


Рис. 1. Фотоцикл ESR [3, 7].

С одной стороны, это связано с активной ролью Asp85 как акцептора протона на стадии продукта M_1 (рис. 1), а с другой – с возможным влиянием этого остатка на параметры фотореакции хромофорной группы.

Целью данной работы было выяснить, влияет ли степень протонирования первичного противоиона хромофорной группы и акцептора протона Asp85 на динамику первичных процессов фотопревращения ESR. Исследование проводили методом фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии в детергентном экстракте ESR при pH 9.5. Данные экспериментов были сопоставлены с ранее полученными результатами исследования фотопревращения ESR при pH 7.4 [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры поглощения. На рис. 2 представлены стационарные спектры поглощения темно- и светоадаптированных образцов ESR, а также спектр возбуждающего импульса, использованного в экспериментах с фемтосекундным временным разрешением. Положение максимума спектров поглощения ESR сильно зависит от pH [2] и при pH 9.5 составляет 524 нм для темноадаптированной формы. При световой адаптации наблюдается незначительное смещение максимума поглощения на 1 нм в синюю область с небольшим падением коэффициента экстинкции. Это, скорее всего, отражает переход RPSB из полностью *транс*- в 13-*цис*-форму в небольшой доле молекул, как было показано для ESR при pH 7.4 [7].

Фемтосекундная спектроскопия ESR. На рис. 3а представлены дифференциальные спектры фотоиндуцированного поглощения ESR, зарегистрированные в диапазоне 400–880 нм. После действия возбуждающего импульса наблюдаются сигналы поглощения (ESA, excited state absorption) и вынужденного испускания (SE, stimulated emission) из возбужденного состояния I, выцветания исходного состояния ESR (GSB, ground state bleaching) и поглощения продуктов фотореакции J и K (PA, product absorption) (рис. 1 и 3). Сигналы ESA присутствуют в коротковолновой (ESA1) и длинноволновой (ESA2) спектральных областях. Наблюдаемые сигналы характерны для

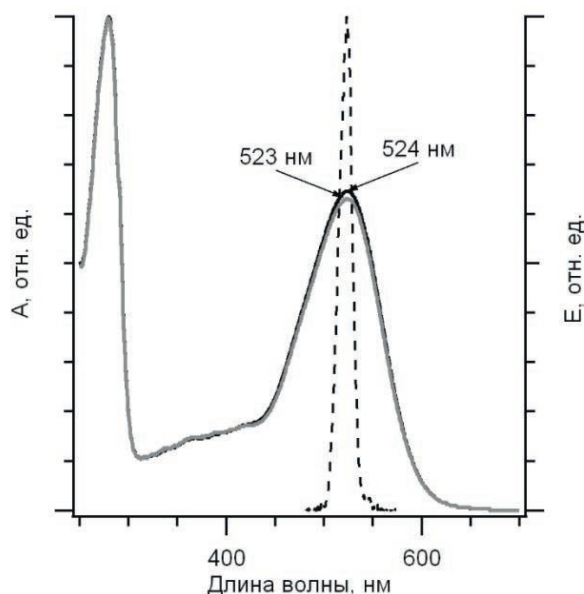


Рис. 2. Нормированные по γ -полосе спектры поглощения темноадаптированного (черная кривая) и светоадаптированного (серая кривая) образцов ESR в DDM с указанием максимумов поглощения. На рисунке также представлен спектр возбуждающего импульса, использованный в экспериментах с фемтосекундным временным разрешением (пунктирная кривая).

первичных реакций ретиналь-содержащих белков [8–13].

Как видно из рис. 3а, ко времени задержки 200 фс образуются ярко выраженная полоса ESA1 (400–500 нм) и слабо выраженные полосы ESA2 (570–680 и 700–800 нм), которые частично перекрываются с полосами GSB (500–550 нм) и SE (670–880 нм). Ко времени задержки 1 пс сигналы ESA1, SE и GSB значительно уменьшаются, а в области 550–700 нм образуется полоса поглощения первого продукта J, содержащего RPSB в 13-цис-форме. Сигнал РА за последующие 10–20 пс смещается в синюю область на 15 нм с небольшим снижением интенсивности, что отражает образование следующего продукта К в процессе колебательной релаксации RPSB. На временах 1–2 пс, когда продукт J уже полностью образован, все еще наблюдаются значительные по интенсивности сигналы ESA1 и SE, что говорит о наличии дополнительного долгоживущего возбужденного состояния, распад которого не ведет к образованию продукта. Ко времени задержки

20 пс сигналы из возбужденного состояния уже не наблюдаются, переход J→К завершен, и дифференциальный спектр состоит только из полосы GSB и полосы поглощения продукта К, время жизни которого при pH 9.5 составляет 2–3 мкс [2].

Кинетические кривые фотоиндуцированного поглощения ESR хорошо иллюстрируют процессы, описанные ранее (рис. 3б). Кинетические кривые на длинах волн 460 и 850 нм отражают возникновение и исчезновение сигналов из возбужденного состояния I – ESA1 и SE соответственно. Кинетическая кривая на длине волны 550 нм отражает появление сигнала GSB ко времени задержки 200 фс за счет исчезновения сигнала ESA1 в этой спектральной области. На более поздних временах сигнал GSB уменьшается за счет возвращения части возбужденных молекул в исходное состояние. Кинетическая кривая на длине волны 600 нм отражает появление сигнала РА продукта J ко времени задержки 1–1.5 пс. Дальнейшее небольшое снижение интенсивности этого сигнала связано с образованием следующего продукта К с более коротковолновым максимумом поглощения в дифференциальном спектре – 585 нм по сравнению с 600 нм продукта J (рис. 3).

Кинетические кривые были проанализированы путем построения модельных трехэкспоненциальных кривых в выделенных спектральных диапазонах зондирования (рис. 3б, пунктирные кривые; табл. 1). Полученные характерные времена τ_1 – τ_3 были приписаны образованию реакционного и нереакционного возбужденных состояний I (τ_1) и процессам распада этих состояний (τ_2 и τ_3 соответственно). В табл. 1 также представлены средние значения полученных времен τ_1 – τ_3 по всем выделенным спектральным диапазонам, в которых они характеризуют один и тот же процесс. Исключение составляет характерное время τ_3' , которое в спектральном диапазоне 600–620 нм отражает время перехода J→К.

Как видно из табл. 1, характерное время τ_1 составляет ~60 фс. Это время характеризует начальную динамику волнового пакета (набора

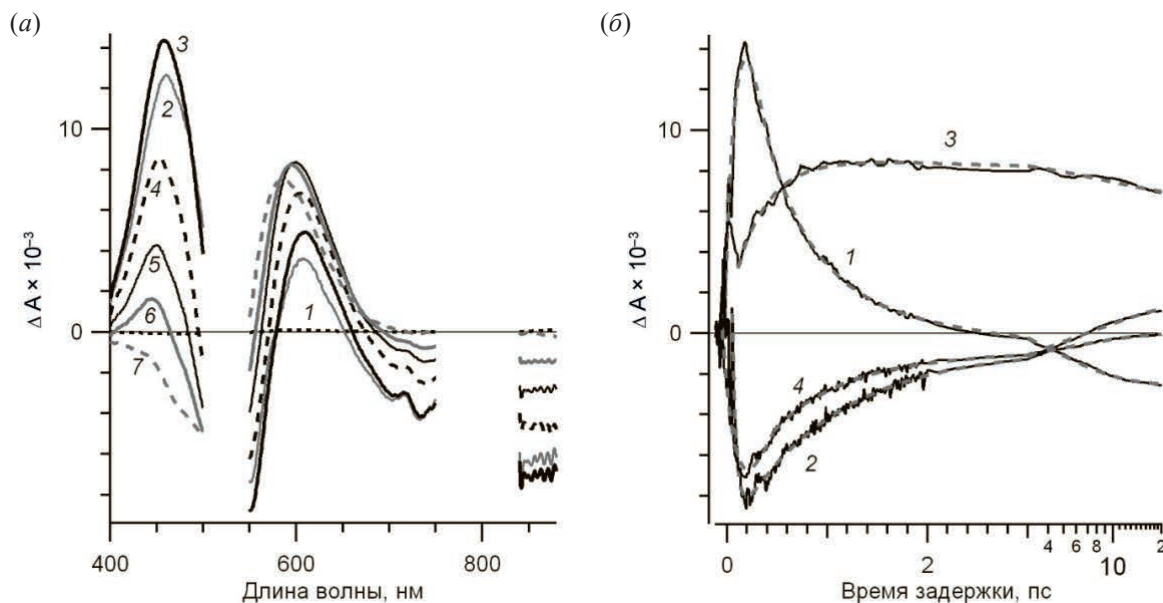


Рис. 3. (а) – Дифференциальные спектры фотоиндуцированного поглощения ESR в DDM, зарегистрированные на временах задержки –0.15 (1), 0.1 (2), 0.18 (3), 0.5 (4), 1 (5), 2 (6) и 20 (7) пс. В спектральных областях импульса возбуждения ($\lambda_{\text{макс}} = 523$ нм) и исходного фемтосекундного импульса ($\lambda_{\text{макс}} = 802$ нм) данные не приведены из-за интенсивного сигнала светорассеяния; (б) – кинетические кривые фотоиндуцированного поглощения ESR в DDM, зарегистрированные на длинах волн зондирования 460 (1), 550 (2), 600 (3) и 850 (4) нм. При времени задержки до 3 пс масштаб линейный, далее – логарифмический. Представлены также модельные экспоненциальные кривые (пунктирные кривые).

Таблица 1. Характерные времена динамики фотореакции ESR в спектральных диапазонах зондирования с доминированием сигналов ESA1, GSB, PA и SE

Сигнал	$\Delta\lambda$, нм	τ_1 , пс	τ_2 , пс	τ_3 , пс	a_2/a_3	τ_3' , пс
ESA1	430–490	0.072 ± 0.002	0.45 ± 0.01	4.0 ± 0.4	0.81/0.19	–
GSB	550–560	0.043 ± 0.001	0.72 ± 0.02	6.1 ± 0.6	–	–
PA	600–620	–	0.31 ± 0.01	–	–	8.5 ± 0.5
SE	850–860	0.06 ± 0.003	0.56 ± 0.03	5.2 ± 1.0	0.8/0.2	–
Среднее значение		0.058 ± 0.002	0.51 ± 0.02	5.1 ± 0.7	0.81/0.19	8.5 ± 0.5

когерентных возбужденных колебательных состояний), созданного фемтосекундным импульсом на поверхности потенциальной энергии (ППЭ) S_1 электронного состояния ESR (рис. 4). Волновой пакет переходит из франк-кондоновского состояния (FC, Franck–Condon) в возбужденное состояние I. Поскольку электронный уровень S_1 имеет характер переноса заряда, переход $FC \rightarrow I$ сопровождается сдвигом положительного заряда от атома азота к β -иононовому коль-

цу RPSB, инверсией связей C–C и C=C полиеновой цепи и быстрой колебательной релаксацией этих связей [14, 15]. Таким образом, время τ_1 отражает динамический сдвиг Стокса. Аналогичный процесс с характерным временем в среднем 50 фс наблюдали при возбуждении других микробных родопсинов [8, 10, 11, 16].

Время τ_2 составляет 0.51 пс (табл. 1) и характеризует процесс распада реакционного возбужденного состояния I, ведущий к образованию

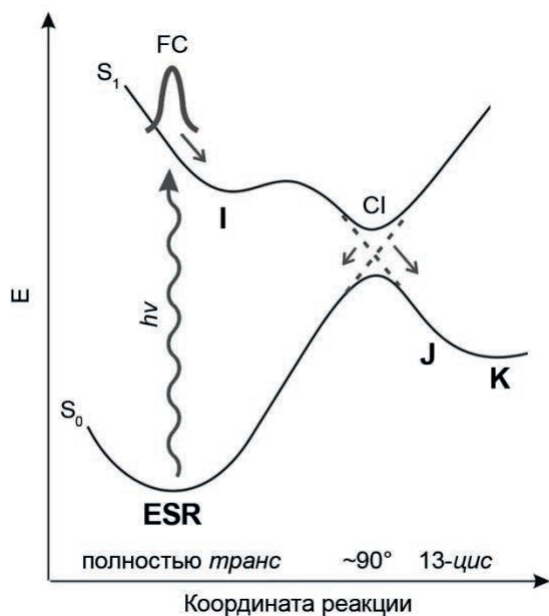


Рис. 4. Строение поверхностей потенциальной энергии ESR, демонстрирующее путь распада реакционного возбужденного состояния. Координата реакции представлена реакционными колебательными модами, отмечены полностью *транс*-, 13-*цис*- и промежуточная формы RPSB. FC – франк-кондоновское состояние, CI – коническое пересечение.

продукта J, содержащего 13-*цис* RPSB, и исходного состояния ESR, содержащего полностью-*транс* RPSB (рис. 4). Время τ_2 хорошо согласуется со временем, за которое протекает фотореакция других микробных родопсинов (в среднем 0.3–0.8 пс) [8, 10–13, 16–18]. Согласно модели трех состояний [19, 20], распад реакционного возбужденного состояния I осуществляется путем преодоления волновым пакетом барьера на S_1 ППЭ и перехода через область конического пересечения (CI, conical intersection) S_1/S_0 ППЭ на S_0 ППЭ продуктов реакции. При этом задействованы реакционные колебательные моды – внеплоскостные колебания атомов водорода (НООР) и торсионные колебания. Барьер на ППЭ электронного уровня S_1 , вероятно, возникает за счет влияния электронного уровня S_2 [19], он характерен для RPSB не только в белковом окружении, но и в вакууме [21], и в растворе [22]. Белковый катализ обычно осуществляется в направлении понижения этого барьера и изменения строения области CI, что значительно ускоряет

фотореакцию и увеличивает ее квантовый выход [8, 10–13, 16–18, 21, 23, 24].

Время τ_3 составляет 5.1 пс и характеризует переход $S_1 \rightarrow S_0$ из нереакционного возбужденного состояния в исходное состояние ESR (табл. 1). Наличие такого пути распада было показано для ESR при pH 7.4 [7], как и для многих других родопсинов, в которых время распада находится в диапазоне ~2–5 пс [8, 10–13, 16–18]. Вклад этого процесса в общую динамику распада возбужденного состояния ESR составляет 19%. Возникновение нереакционных возбужденных состояний скорее всего связано с особой топологией ППЭ основного и возбужденных электронных уровней RPSB, которая может выражаться в увеличении барьера на S_1 ППЭ, а также в отсутствии или особом строении области CI, благоприятном для образования исходного состояния.

Время $\tau_3' = 8.5$ пс, полученное в спектральном диапазоне 600–620 нм, было приписано переходу $J \rightarrow K$, в процессе которого завершается фотоизомеризация и последующая колебательная релаксация напряженной 13-*цис*-формы RPSB [25, 26].

Таким образом, для ESR в DDM при pH 9.5 были рассчитаны характерные времена следующих процессов: начальной динамики волнового пакета (~60 фс), распада реакционного и нереакционного возбужденных состояний I (0.51 и 5.1 пс соответственно) с соотношением 0.81/0.19, а также перехода $J \rightarrow K$ (8.5 пс). Аналогичные процессы наблюдались при исследовании ESR при pH 7.4, характерные времена которых составили 50 фс, 0.69, 5 и 6.3 пс соответственно [7]. Таким образом, при увеличении pH от 7.4 до 9.5 уменьшается время фотореакции от 0.69 до 0.51 пс и увеличивается время перехода $J \rightarrow K$ от 6.3 до 8.5 пс. Соотношение интенсивностей сигналов PA ($t = 20$ пс) и ESA1 ($t = 200$ фс) зависит от общего квантового выхода фотореакции. Поэтому, используя данные, полученные в настоящей работе и ранее [7], можно оценить, что при повышении pH от 7.4 до 9.5 общий квантовый выход фотореакции ESR увеличивается на ~35%.

Наличие нескольких возбужденных состояний с разной динамикой распада связывают с разделением путей реакции в FC-состоянии [27, 28]

или с исходной гетерогенностью белковой части молекулы и/или хромофора [11–13, 29]. Начальная гетерогенность белковой части молекулы была выявлена методами КМ/ММ-моделирования для натриевого насоса эубактерии *Krokinobacter eikastus* (KR2) [30]. Для “зеленого” протеродопсина (GPR), родственного ESR, было показано, что динамика возбужденного состояния напрямую связана с влиянием первичного противоиона Asp97 на RPSB [12]. Благодаря высокому значению $pK_a \sim 7.5$ [31], этот аминокислотный остаток при слабощелочных значениях pH нативной для GPR морской среды присутствует одновременно в протонированной и депротонированной формах, последняя из которых активно взаимодействует с протоном основания Шиффа. Депротонированная форма Asp97 значительно ускоряет фотореакцию и увеличивает ее общий квантовый выход, а протонированная форма может быть основной причиной возникновения нереакционных возбужденных состояний. Аналогичные результаты были получены для бактериородопсина – протонного насоса археи *Halobacterium salinarum*, канального родопсина зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* и KR2 [11, 13, 16]. Результаты, полученные в настоящей работе, демонстрируют, что первичный противоион Asp85 оказывает на динамику фотореакции ESR похожее воздействие. При повышении pH от 7.4 до 9.5 доля протонированной формы первичного противоиона Asp85 в комплексе с His57 уменьшается [2], что приводит к увеличению доли молекул с водородной связью между Asp85 и протоном основания Шиффа. Такая водородная связь влияет на всю структуру электронных уровней S_0 , S_1 и S_2 RPSB, приводя к ускорению фотореакции и увеличению ее квантового выхода [1, 19]. Полученные данные объясняют эффективное образование последующих короткоживущих продуктов фотопериода ESR и активный транспорт протонов при высоких значениях pH [2, 3].

Регулирование основных параметров фотореакции RPSB путем протонирования/депротонирования первичного противоиона (Glu) было выявлено в родопсинах не только I типа, но и II типа, в которых этот аминокислотный

остаток к тому же влияет на pK_a основания Шиффа, спектральную настройку и образование сигнального состояния метародопсина II [1, 32, 33].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы были приобретены у Sigma (США), Panreac (Испания) и Anatrace (США).

Приготовление образцов ESR. ESR экспрессировали в *Escherichia coli* C41(DE3), очищали хроматографически и экстрагировали из клеточных мембран с помощью детергента DDM, как описано ранее [4, 7]. В результате были получены образцы ESR (0.1% DDM, 100 мМ NaOH, 50 мМ CHES, pH 9.5) с концентрацией 2.2–3.5 мг/мл и оптической плотностью в максимуме α -полосы поглощения 2.5–3.8 о.е./1 см.

Стационарная спектроскопия ESR. Стационарные спектры поглощения ESR регистрировали с помощью спектрофотометра UV 1700 (Shimadzu, Япония) и кварцевых кювет с длиной оптического пути 0.1 и 1 см. Темновую адаптацию ESR проводили в течение 72 ч при 4°C. Световую адаптацию осуществляли освещением галогенной лампой (КГМ24-250, 24 В, 250 Вт) в течение 3 мин.

Фемтосекундная абсорбционная спектроскопия. Спектры фотоиндуцированного поглощения измеряли на фемтосекундной установке методом “возбуждение-зондирование” [34]. Возбуждение образца осуществляли импульсами гауссовой формы с частотой 60 Гц, длительностью 28 фс, длиной волны 523 нм, энергией 80 нДж и диаметром 300 мкм в образце. Для зондирования использовали импульс суперконтинуума с энергией 10 нДж, диаметром 100 мкм и поляризацией по отношению к импульсу возбуждения под углом 54.7°. Шаг зондирующего импульса во временных диапазонах 0–3, 3–10 и 10–20 пс составлял 3.3, 10 и 50 фс соответственно. Дифференциальные спектры поглощения $\Delta A(\lambda)$ регистрировали в спектральном диапазоне 400–880 нм. Все эксперименты проводили при 21°C в кварцевой проточной кювете диаметром 0.5 мм с толщиной окна 0.1 мм. Для обработки данных применяли программное обеспечение Span, написанное с использованием пакета приложений Matlab.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе была исследована фотореакция ESR при pH 9.5, при котором первичный противоион Asp85 в комплексе с His57 почти полностью депротонирован. Показано, что начальная динамика волнового пакета характеризуется временем ~60 фс, фотореакция протекает за время 0.51 пс, время перехода из первого продукта J во второй продукт K составляет 8.5 пс, а время распада нереакционного возбужденного состояния – 5.1 пс. Также было продемонстрировано, что значение pH в диапазоне 7.4–9.5 влияет на скорость и эффективность фотореакции ESR.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что у ESR повышение эффективности функции светозависимого протонного транспорта при высоких значениях pH может быть связано с повышением эффективности первичных процессов при фотореакции этого микробного родопсина в фемто-пикосекундном диапазоне времени. Этот факт подтверждает важную роль степени протонирования противоиона хромофорной группы в фотоактивируемых процессах родопсинов.

Необходимы дальнейшие исследования в более широком диапазоне pH, чтобы выявить механизм взаимодействия RPSB с первичным противоионом не только в ESR, но и в других родопсинах.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение о предоставлении гранта № 075-15-2020-795 от 29.09.2020 г., уникальный идентификатор проекта: RF-190220X0027, номер государственной регистрации темы исследования: 122041400102-9).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ernst O.P., Lodowski D.T., Elstner M., Hegemann P., Brown L.S., Kandori H. // *Chem. Rev.* 2014. V. 114. P. 126–163.
<https://doi.org/10.1021/cr4003769>
2. Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Imasheva E.S., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. // *Biochemistry*. 2012. V. 51. P. 5748–5762.
<https://doi.org/10.1021/bi300409m>
3. Dioumaev A.K., Petrovskaya L.E., Wang J.M., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. // *J. Phys. Chem. B*. 2013. V. 117. P. 7235–7253.
<https://doi.org/10.1021/jp402430w>
4. Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Chupin V.V., Sychev S.V., Lyukmanova E.N., Kryukova E.A., Ziganshin R.H., Spirina E.V., Rivkina E.M., Khatypov R.A., Erokhina L.G., Gilichinsky D.A., Shuvalov V.A., Kirpichnikov M.P. // *FEBS Lett.* 2010. V. 584. P. 4193–4196.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.005>
5. Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Imasheva E.S., Lukashev E.P., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 21254–21265.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.465138>
6. Siletsky S.A., Mamedov M.D., Lukashev E.P., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Petrovskaya L.E. // *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* 2016. V. 1857. P. 1741–1750.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.08.004>
7. Smitienko O.A., Feldman T.B., Petrovskaya L.E., Nekrasova O.V., Yakovleva M.A., Shelaev I.V., Gostev F.E., Cherepanov D.A., Kolchugina I.B., Dolgikh D.A., Nadtochenko V.A., Kirpichnikov M.P., Ostrovsky M.A. // *J. Phys. Chem. B*. 2021. V. 125. P. 995–1008.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c07763>
8. Arlt T., Schmidt S., Zinth W., Haupts U., Oesterhelt D. // *Chem. Phys. Lett.* 1995. V. 241. P. 559–565.
[https://doi.org/10.1016/0009-2614\(95\)00664-P](https://doi.org/10.1016/0009-2614(95)00664-P)
9. Wand A., Loevsky B., Friedman N., Sheves M., Ruhman S. // *J. Phys. Chem. B*. 2013. V. 117. P. 4670–4679.
<https://doi.org/10.1021/jp309189y>

10. Inoue K., Tahara S., Kato Y., Takeuchi S., Tahara T., Kandori H. // *J. Phys. Chem. B*. 2018. V. 122. P. 6453–6461.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b01279>
11. Tahara S., Takeuchi S., Abe-Yoshizumi R., Inoue K., Ohtani H., Kandori H., Tahara T. // *J. Phys. Chem. B*. 2018. V. 122. P. 4784–4792.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b01934>
12. Chang C.-F., Kuramochi H., Singh M., Abe-Yoshizumi R., Tsukuda T., Kandori H., Tahara T. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2019. V. 21. P. 25728–25734.
<https://doi.org/10.1039/C9CP04991F>
13. Chang C.-F., Kuramochi H., Singh M., Abe-Yoshizumi R., Tsukuda T., Kandori H., Tahara T. // *Chem. Int. Ed.* 2022. V. 61. P. e202111930.
<https://doi.org/10.1002/anie.202111930>
14. McCamant D.W., Kukura P., Mathies R.A. // *J. Phys. Chem. B*. 2005. V. 109. P. 10449–10457.
<https://doi.org/10.1021/jp050095x>
15. Yu J.K., Liang R., Liu F., Martinez T.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. V. 141. P. 18193–18203.
<https://doi.org/10.1021/jacs.9b08941>
16. Scholz F., Bamberg E., Bamann C., Wachtveitl J. // *Biophys. J.* 2012. V. 102. P. 2649–2657.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.034>
17. Slouf V., Balashov S.P., Lanyi J.K., Pullerits T., Polivka T. // *Chem. Phys. Lett.* 2011. V. 516. P. 96–101.
<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2011.09.062>
18. Iyer E.S.S., Misra R., Maity A., Liubashevski O., Sudo Y., Sheves M., Ruhman S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2016. V. 138. P. 12401–12407.
<https://doi.org/10.1021/jacs.6b05002>
19. Gozem S., Luk H.L., Schapiro I., Olivucci M. // *Chem. Rev.* 2017. V. 117. P. 13502–13565.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00177>
20. Gozem S., Johnson P.J.M., Halpin A., Luk H.L., Morizumi T., Prokhorenko V.I., Ernst O. P., Olivucci M., Miller R.J.D. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2020. V. 11. P. 3889–3896.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.0c01063>
21. Kiefer H.V., Gruber E., Langeland J., Kusochek P.A., Bochenkova A.V., Andersen L.H. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 1210.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09225-7>
22. Zgrablic G., Novello A.M., Parmigiani F. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. P. 955–961.
<https://doi.org/10.1021/ja205763x>
23. Govindjee R., Balashov S.P., Ebrey T.G. // *Biophys. J.* 1990. V. 58. P. 597–608.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(90\)82403-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(90)82403-6)
24. Koyama Y., Kubo K., Komori M., Yasuda H., Mukai Y. // *Photochem. Photobiol.* 1991. V. 54. P. 433–443.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1991.tb02038.x>
25. Doig S.J., Reid P.J., Mathies R.A. // *J. Phys. Chem.* 1991. V. 95. P. 6372–6379.
<https://doi.org/10.1021/j100169a054>
26. Shim S., Dasgupta J., Mathies R.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 7592–7597.
<https://doi.org/10.1021/ja809137x>
27. Huber R., Kohler T., Lenz M.O., Bamberg E., Kalmbach R., Engelhard M., Wachtveitl J. // *Biochemistry*. 2005. V. 44. P. 1800–1806.
<https://doi.org/10.1021/bi048318h>
28. Amsden J.J., Kralj J.M., Chieffo L.R., Wang X., Erramilli S., Spudich E.N., Spudich J.L., Ziegler L.D., Rothschild K.J. // *J. Phys. Chem. B*. 2007. V. 111. P. 11824–11831.
<https://doi.org/10.1021/jp073490r>
29. Hasson K.C., Gai F., Anfinrud P.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 15124–15129.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15124>
30. Kusochek P.A., Scherbinin A.V., Bochenkova A.V. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2021. V. 12. P. 8664–8671.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.1c02312>
31. Imasheva E.S., Balashov S.P., Wang J.M., Dioumaev A.K., Lanyi J.K. // *Biochemistry*. 2004. V. 43. P. 1648–1655.
<https://doi.org/10.1021/bi0355894>
32. Menon S.T., Han M., Sakmar T.P. // *Physiol. Rev.* 2001. V. 81. P. 1659–1688.
<https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.4.1659>
33. Kandori H. // In: *Supramolecular Photochemistry: Controlling Photochemical Processes*. Chapter 14 / Eds. Ramamurthy V., Inoue Y. John Wiley & Sons, Inc., 2011. P. 571–595.
<https://doi.org/10.1002/9781118095300.ch14>
34. Shelaev I.V., Gostev F.E., Mamedov M.D., Sarkisov O.M., Nadtochenko V.A., Shuvalov V.A., Semenov A.Y. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 1797. P. 1410–1420.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.026>

Ultrafast Photochemical Reaction of *Exiguobacterium sibiricum* Rhodopsin (ESR) at Alkaline pH

O. A. Smitienko^{*, #}, T. B. Feldman^{*, **}, L. E. Petrovskaya^{***}, E. A. Kryukova^{*, ***},
I. V. Shelaev^{****}, F. E. Gostev^{****}, D. A. Cherepanov^{****}, I. B. Kolchugina^{**},
D. A. Dolgikh^{*, **, ***}, V. A. Nadtochenko^{****},
M. P. Kirpichnikov^{*, **}, and M. A. Ostrovsky^{*, **}

[#] Phone: +7 (926) 470-77-17; e-mail: djolia@gmail.com

^{*} Emanuel Institute of Biochemical Physics, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334, Russia

^{**} Department of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie gory 1, Moscow, 119991 Russia

^{***} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
ul. Mikluho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{****} Semenov Federal Research Center of Chemical Physics,
ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

Rhodopsin from the eubacterium *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) performs the function of light-dependent proton transport. The operation of ESR is based on the ultrafast photochemical reaction of isomerization of the retinal chromophore, which triggers dark processes closed in the photocycle. Many parameters of the photocycle are determined by the degree of protonation of Asp85 – the primary counterion of the chromophore group and the proton acceptor. ESR in detergent micelles pumps protons most efficiently at pH > 9, when Asp85 is almost completely deprotonated. In this work, the photochemical reaction of ESR at pH 9.5 was studied by femtosecond laser absorption spectroscopy. It was shown that photoisomerization of the chromophore group occurs in 0.51 ps, and the contribution of the reactive excited state is about 80%. A comparison with the data we obtained at pH 7.4 showed that at pH 9.5 the reaction proceeds much faster and more efficiently. The data obtained confirm the important role of the chromophore group counterion in the photoactivated processes of rhodopsins.

Keywords: rhodopsins, retinal, photochemistry, femtosecond spectroscopy



УДК 577.112;577.336

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДНЫХ ЛИНКЕРОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГИБРИДНЫХ СТРУКТУР С ИЗБИРАТЕЛЬНЫМ рН-ЗАВИСИМЫМ СВЯЗЫВАНИЕМ С РАКОВЫМИ КЛЕТКАМИ¹

© 2024 г. А. Ю. Фролова*,[#], А. А. Пахомов*, С. М. Деев*, В. И. Мартынов*

* ФГБУН "Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова" РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 01.12.2023 г.

После доработки 30.12.2023 г.

Принята к публикации 31.12.2023 г.

Большинство современных методов терапии рака неспецифичны и оказывают побочное вредное воздействие на организм. В настоящее время разрабатываются методы нацеленной терапии рака, в частности с применением адресных пептидов, избирательно связывающихся с раковыми клетками. Цель настоящей работы – изучение перспектив применения пептида pHLP, связывающегося с раковыми клетками при пониженном pH, в составе рекомбинантных белково-пептидных конструкций для диагностики и адресной терапии рака. Получены гибридные структуры на основе флуоресцентного белка EGFP и линкерной последовательности, соединяющей флуоресцентный белок с двумя различными вариантами pHLP. Изучено влияние различных линкеров на pH-зависимое связывание конструкций с клетками, а также на эффективность синтеза хромофора EGFP в составе гибридной конструкции.

Ключевые слова: флуоресцентный белок, EGFP, pHLP, адресная терапия рака, ацидоз, тераностика

DOI: 10.31857/S0132342324040113, **EDN:** MWPLFG

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время при лечении онкологических заболеваний применяются методы лучевой, радиоизотопной, гормональной, иммуно- и химиотерапии. Специфичность этих методов оставляет желать лучшего, и в большинстве случаев их применение оказывает вредное побочное воздействие на весь организм человека. В связи с этим в современной прецизионной медицине делается акцент на препараты, обладающие нацеленным действием на пораженные ткани, в частности пред-

принимаются попытки создания таких адресных препаратов на основе антител и других лигандов к определенным антигенам или рецепторам, гиперэкспрессирующимся на поверхности некоторых раковых клеток. Однако нестабильная экспрессия этих маркеров существенно затрудняет применение данного метода. Также при использовании этих средств часто возникает резистентность за счет клональной селекции, которая затрудняет терапию. Кроме того, обычные клетки экспрессируют те же онкомаркерные белки, что приводит к побочным

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0132342324040113 для авторизованных пользователей.

Сокращения: ФБ – флуоресцентный белок; EGFP – улучшенный вариант зеленого флуоресцентного белка из *Aequorea victoria*; pHLP – пептидный фрагмент бактериородопсина, проявляющий pH-зависимое связывание с мембранными структурами (pH Low Insertion Peptide); pHLPwt – природный пептид pHLP; pHLPvar3 – мутантный укороченный вариант pHLP.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-51-11; эл. почта: anastasiya_frolova_box@mail.ru).

эффектам при терапии с помощью антител и других адресных лигандов.

Другой, более универсальный подход основан на различиях в физико-химических свойствах нормальных и опухолевых клеток. Известно, что процесс опухолеобразования может сопровождаться понижением pH во внеклеточном пространстве (pH 6.0–6.7). Недавние исследования [1, 2], в том числе проведенные в нашей лаборатории [3], показали, что один из трансмембранных пептидных фрагментов белка бактериородопсина (pHLIP) демонстрирует pH-зависимое связывание с плазматической мембраной клетки. При значениях pH 7.2–7.4 он преимущественно находится в водной фазе, однако при pH < 7.0 наблюдается встраивание пептида в мембрану. При этом показано, что pHLIP обладает способностью переносить различные низкомолекулярные соединения (< 7 кДа) через мембрану живой клетки в цитоплазму [2]. Для получения таких конструкций обычно используется твердофазный синтез пептида, затем низкомолекулярные соединения конъюгируют с pHLIP химическими методами [4]. Однако способность pHLIP доставлять более высокомолекулярные соединения, в том числе белки, к настоящему времени изучена не столь подробно [5–8].

Ранее нами были получены модельные конструкции в виде конъюгатов пептида pHLIP с белками [3]. Они представляли собой гибридные структуры на основе флуоресцентного белка (ФБ) EGFP и линкерной последовательности, соединяющей ФБ с двумя различными вариантами пептида: с пептидом дикого типа (pHLIPwt) и его укороченным мутантным вариантом Var3 (pHLIPvar3) [9]. Нами было продемонстрировано эффективное pH-зависимое связывание этих конструкций с клетками.

В настоящей работе получены конструкции, несущие те же функциональные части, но другую линкерную последовательность между доменами, и продемонстрировано влияние различных линкеров на функциональные свойства этих конструкций, в том числе на pH-зависимое связывание с раковыми клетками и на эффективность синтеза хромофора ФБ в составе белково-пептидной конструкции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн и наработка конструкций EGFP/pHLIP. Для более подробного изучения возможности применения pHLIP-технологии для доставки к раковым клеткам высокомолекулярных соединений были получены гибридные конструкции, состоящие из пептидов pHLIP и белкового компонента. Последний был представлен флуоресцентным белком EGFP, выполняющим роль как модельного груза, переносимого при помощи pHLIP, так и флуоресцентной метки, обладающей высокой яркостью (рис. 1). В качестве pH-чувствительной составляющей были выбраны два варианта пептида: природный pHLIPwt и его укороченный мутантный вариант pHLIPvar3. В предыдущей работе [3] конструкции содержали короткий пептидный линкер –GS–, соединяющий белковую часть в виде EGFP с пептидом pHLIP. В настоящей работе в качестве линкера мы использовали удлиненную последовательность аминокислот –IEGRCGS–, которая, с одной стороны, содержит заряженные группы, способствующие большей растворимости в водной среде, а с другой стороны, за счет скомпенсированности в целом заряжены нейтрально. Согласно литературным данным, встраивание pH-чувствительных пептидов происходит с транслокацией их C-конца через

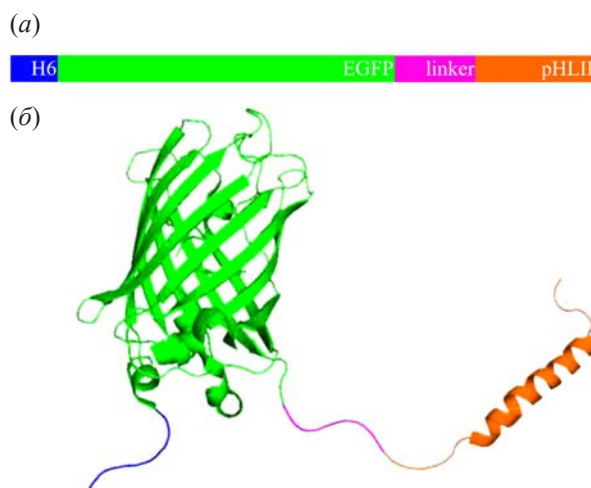


Рис. 1. Упрощенная схема (а) и пространственная модель (б) гибридных конструкций. Гексагистициновая метка обозначена синим цветом, флуоресцентный белок – зеленым, линкер (linker) – лиловым, pHLIP – оранжевым.

мембрану клетки [1], поэтому все гибридные конструкции содержали гексагистициновую метку на своем N-конце. Нарботку полученных конструкций и контрольного EGFP проводили одновременно в бактериальных клетках *Escherichia coli* штамма BL21 (DE3). Выделение белково-пептидных конструкций выполняли при помощи металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Их чистоту и целостность подтверждали при помощи SDS-электрофореза в 12%-ном ПААГ (рис. S2 в дополнительных материалах).

Эффективность созревания хромофора флуоресцентного белка в конструкциях EGFP/pHLIP. Известно, что синтез хромофора ФБ происходит автокаталитически в присутствии кислорода в качестве окислителя. Один из ключевых факторов эффективности автокатализа – правильная упаковка белка [10]. В этом ключе ФБ – хороший модельный объект для демонстрации возможного влияния pHLIP и линкеров на функциональную активность белка в составе гибридной конструкции.

Мы изучили влияние пептидов pHLIP на синтез хромофора EGFP в составе гибридных структур. Для этого регистрировали спектры поглощения каждой конструкции (рис. 2) и определяли общую концентрацию белково-пептидных конструкций при 280 нм и концентрации конструкций с полностью созревшим хромофором по поглощению при 488 нм. Степень созревания хромофора определяли отношением значений концентрации конструкций с полностью созревшим хромофором к общей концентрации. В контрольном белке EGFP степень созревания хромофора составила ~77% (табл. 1). В случае белково-пептидных конструкций, содержащих GS-линкер, хромофор синтези-

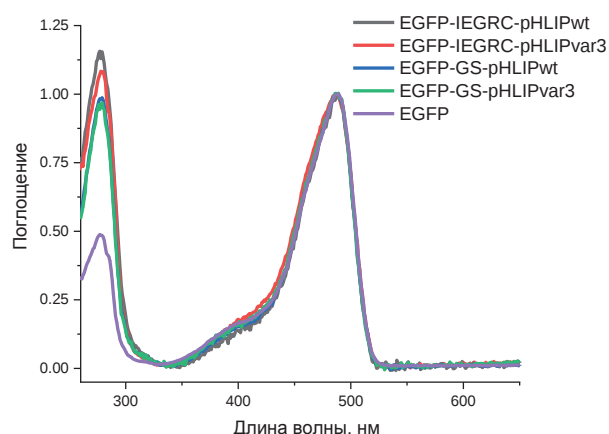


Рис. 2. Нормализованные спектры поглощения конструкций EGFP/pHLIP и EGFP.

ровался примерно на 20% хуже относительно контроля, а в конструкциях с линкером IEGRCGS – примерно на 30%.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что пептид pHLIP в составе пептидно-белковых конструкций может влиять на эффективность синтеза хромофора ФБ, причем степень влияния зависит и от природы линкера. Нарушение процесса синтеза хромофора ФБ может быть вызвано как нарушением упаковки белка, так и аллостерическими эффектами.

pH-зависимое связывание конструкций EGFP/pHLIP с клетками HeLa согласно данным проточной цитофлуориметрии. Для анализа связывания полученных гибридных конструкций с раковыми клетками HeLa при понижении pH использовали метод проточной цитофлуориметрии. Был протестирован диапазон значений pH 5.6–7.4 с шагом 0.2 единицы. В качестве контроля неспецифического связывания использовали свободный EGFP.

Таблица 1. Свойства конструкций EGFP/pHLIP и EGFP

№	Конструкция	ϵ_{280} , М ⁻¹ см ⁻¹	Степень созревания хромофора, %	Степень созревания хромофора относительно EGFP, %	Молекулярный вес, Да
1	EGFP-IEGRCGS-pHLIPwt	34 380	55	71	32 122
2	EGFP-IEGRCGS-pHLIPvar3	32 890	55	71	31 232
3	EGFP-GS-pHLIPwt	34 380	64	83	31 564
4	EGFP-GS-pHLIPvar3	32 890	63	81	30 674
5	EGFP (контроль)	20 400	77	100	27 429

При нейтральных значениях pH клетки, обработанные EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt и EGFP-GS-pHLIPwt, обладали низким значением флуоресцентного сигнала, сопоставимым с контрольными клетками, обработанными EGFP. Однако при $\text{pH} < 6.8$ наблюдалось многократное увеличение флуоресцентного сигнала клеток с $\text{pK}_a \sim 6.4$ (рис. 3, табл. 2), при этом связывание конструкции, содержащей линкер IEGRCSG, было в несколько раз эффективнее. Аналогичный результат наблюдался при сравнительном тестировании конструкций EGFP-IEGRCSG-pHLIPvar3 и EGFP-GS-pHLIPvar3. В конструкциях, содержащих IEGRCSG-линкер, интенсивность флуоресцентного сигнала клеток оказалась выше. Это свидетельствует об однозначном увеличении эффективности связывания при замене GS-линкера на IEGRCSG в гибридных конструкциях (табл. 2).

Стоит также отметить, что pH-зависимое связывание EGFP-IEGRCSG-pHLIPvar3 с раковыми клетками характеризовалось двумя pK_a (наблюдалось два перегиба, табл. 2), при этом основное связывание происходит с $\text{pK}_a \sim 5.9$. Это свидетельствует о возникновении дополнительных pH-зависимых перестроек в этой конструкции, которые стали возможны при введении последовательности IEGRCSG в линкер. Однако несмотря на то, что эффективность связывания конструкции с pHLIPvar3 выросла, она все же остается ниже, чем у EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt.

Ранее сообщалось, что при доставке низкомолекулярных красителей pHLIPvar3 обладал улучшенными по сравнению с pHLIPwt показателями накопления в опухолях [9]. Однако при тестировании этих пептидов в виде конъюгатов с белковым компонентом *in vitro* наблюдалась обратная ситуа-

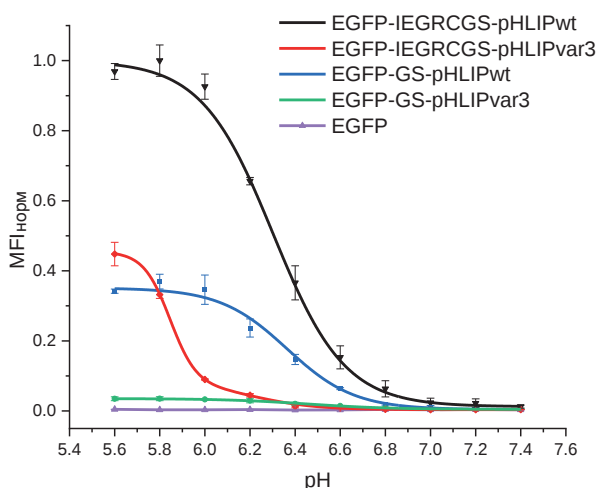


Рис. 3. pH-зависимое связывание с клетками HeLa конструкций EGFP/pHLIPwt и EGFP/pHLIPvar3 с линкерами GS и IEGRCSG при различных значениях pH. Значения медиан интенсивности флуоресценции (MFI) нормированы относительно EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt (наиболее эффективно связывающейся конструкции) с поправкой на степень созревания хромофора.

ция: конструкции с pHLIPwt демонстрировали более эффективное связывание при понижении pH в сравнении с pHLIPvar3 при использовании одного и того же линкера [3]. Полученные в этой работе данные также подтверждают эту закономерность.

pH-зависимое связывание конструкций EGFP/pHLIPwt с клетками HeLa по данным флуоресцентной микроскопии. При помощи конфокальной флуоресцентной микроскопии были протестированы конструкции, которые продемонстрировали наиболее эффективное pH-зависимое связывание и оптимальные pK_a в цитофлуориметрическом исследовании – EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt и EGFP-GS-pHLIPwt. Эти конструкции инкубиро-

Таблица 2. Эффективность pH-зависимого связывания белково-пептидных конструкций с клетками HeLa

№	Конструкция	pK_a	Относительное количество белка, связавшегося с клетками*
1	EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt	6.30 ± 0.01	1
2	EGFP-GS-pHLIPwt	6.36 ± 0.03	0.35
3	EGFP-IEGRCSG-pHLIPvar3	6.22 ± 0.33 , 5.85 ± 0.03	0.46
4	EGFP-GS-pHLIPvar3	6.46 ± 0.02	0.035

* Количество белка, связавшегося с клетками, оценивали по значению F_a – кислотной базовой линии (см. раздел “Эксперим. часть”) относительно EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt.

вали с клетками HeLa при pH 6.2 и 7.4, проводили отмывку при помощи PBS, фиксировали клетки 4%-ным раствором формалина и окрашивали ядра меткой Hoechst 33342.

Согласно полученным данным, обе конструкции связывались с мембранами клеток при pH 6.2, однако уровень зеленого флуоресцентного сигнала был выше в случае обработки клеток EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt (рис. 4). При pH 7.4 ни одна из рекомбинантных конструкций не связывалась с мембранами клеток. На контрольных клетках, обработанных EGFP аналогичным образом при pH 6.2 и 7.4, в обоих случаях не наблюдалось свя-

зывания (рис. S3 в дополнительных материалах). Эти результаты подтверждают данные по pH-зависимому связыванию конструкций, полученные методом проточной цитофлуориметрии.

Следует отдельно отметить, что согласно литературным данным, все полученные ранее конструкции pHLP с низкомолекулярными соединениями, липосомами и с наночастицами обладали также побочным неспецифическим связыванием с мембранами клеток при физиологических значениях pH [9, 10]. Однако полученные нами гибридные белково-пептидные конструкции как в данной работе, так и в более ранних исследова-

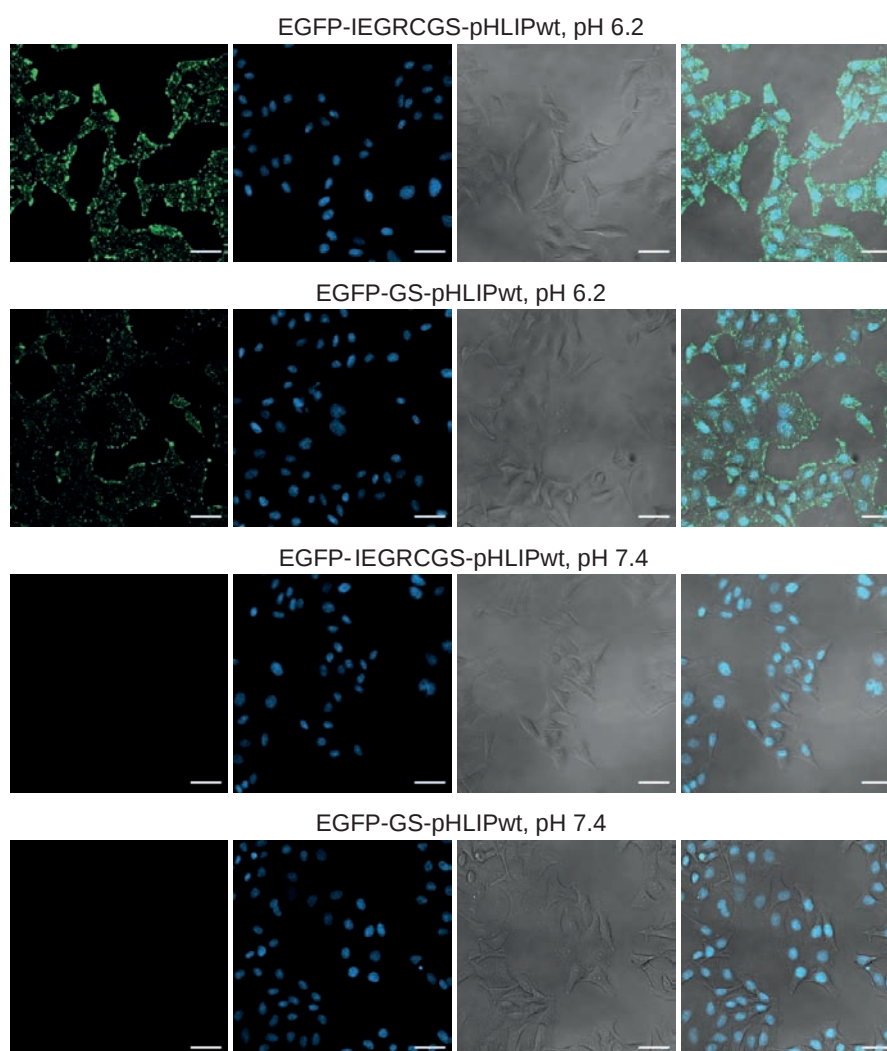


Рис. 4. pH-зависимое связывание EGFP/pHLIPwt с клетками HeLa, определенное с помощью конфокальной микроскопии. Слева направо: изображения в зеленом (EGFP, возбуждение 488 нм, излучение 500–550 нм) и синем (Hoechst 33258, возбуждение 405 нм, излучение 420–470 нм) каналах флуоресценции, проходящем свете и их наложение. Масштабный отрезок 20 мкм.

ниях [3, 8] демонстрировали селективное pH-зависимое связывание и практически полное отсутствие взаимодействия с мембраной клеток при нейтральных значениях pH. По-видимому, это обусловлено присутствием гидрофильного ФБ, который обеспечивает высокую водорастворимость полученных конструкций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дизайн и синтез рекомбинантных гибридных конструкций EGFP-pHLIP. Были получены гены, кодирующие последовательность зеленого флуоресцентного белка (EGFP) и пептидов pHLIP в одной рамке считывания. Для этого использовали полимеразную цепную реакцию с геном EGFP в качестве матрицы и серией прямых и обратных праймеров, кодирующих дополнительные последовательности на 3'-концах. кДНК клонировали по сайтам BamHI и HindIII модифицированного вектора экспрессии pET-24a, несущего между сайтами NdeI и BamHI гексагистидиновую последовательность. Последовательности кДНК для всех полученных генов были проверены путем секвенирования. Полные нуклеотидные и аминокислотные последовательности гибридных конструкций EGFP-IEGRCGS-pHLIPwt и EGFP-IEGRCGS-pHLIPvar3 представлены на рис. S1 в дополнительных материалах.

Наработка белков в *E. coli* и их выделение. Для получения гибридных белково-пептидных конструкций в достаточных количествах клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали плазмидой pET-24, содержащей интересующий ген, и выращивали в жидкой питательной среде LB с добавлением канамицина (25 мг/мл) при 37°C при перемешивании со скоростью 250 об/мин до достижения оптической плотности 0.6–0.8 при 600 нм. После этого добавляли IPTG (0.4 мМ) и выращивали клетки в течение 4 ч при 37°C, а затем дополнительно инкубировали в течение ночи при 18°C. Затем суспензию клеток осаждали центрифугированием при 3000 *g* в течение 15 мин при 4°C. Полученные осадки хранили при –20°C. Для выделения целевых конструкций клетки размораживали, ресуспендировали в промывочном буфере (50 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазола, pH 8.0) и затем разрушали при помощи

ультразвукового дезинтегратора Sonopulse HD 3100 (Bandeline, Германия). Клеточный лизат осаждали центрифугированием при 20 000 *g* в течение 30 мин при 4°C. После этого супернатант наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой (Qiagen, Нидерланды), предварительно уравновешенной промывочным буфером. После нанесения колонку промывали 5-кратным объемом промывочного буфера и элюировали буфером, содержащим 50 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 250 мМ имидазола, pH 8.0. Выделенные конструкции переводили в PBS с использованием гель-фильтрационных колонок Micro Bio-Spin™ 6 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США), заполненных Bio-Gel P-6 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Чистоту и целостность гибридных конструкций подтверждали при помощи SDS-электрофореза в 12%-ном ПААГ, выполненного по стандартному протоколу.

Определение концентрации гибридных конструкций при помощи спектрофотометрии. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Cary 50 Bio (Varian, США). Общие концентрации гибридных конструкций определяли по поглощению при 280 нм, а концентрации конструкций со зрелым хромофором – при 488 нм. Расчеты коэффициентов экстинкции при 280 нм (табл. 1) проводили на основе аминокислотной последовательности при помощи программного обеспечения SnapGene (GSL Biotech LLC, США). Коэффициент экстинкции EGFP со зрелым хромофором при 488 нм принимали равным 55 000 М⁻¹ см⁻¹ [11].

Культивирование клеток. Клетки карциномы шейки матки человека HeLa выращивали в среде DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с добавлением фетальной бычьей сыворотки (FBS, Thermo Fisher Scientific Inc., США) до 10%, L-глутамина до 2 мМ (ПанЭко, Россия), 100 ед./мл пенициллина и 0.1 мг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Клетки культивировали во влажной атмосфере при 37°C и 5% CO₂. Среду обновляли каждые 2–3 дня.

Проточная цитофлуориметрия. Клетки HeLa выращивали в культуральных флаконах T-25 до конфлюэнтности ~90% (~2 млн клеток на флакон). Затем среду удаляли, добавляли 1 мл раствора

Версена и инкубировали клетки при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. После 10 мин инкубации клетки ресуспендировали до получения гомогенной суспензии и центрифугировали 3 мин при 125 g. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 600 мкл PBS с добавлением FBS до 10%. Образцы для исследования готовили при помощи смешивания 3 мкл полученной клеточной суспензии с 97 мкл буферного раствора желаемого pH (диапазон значений pH 5.6–7.4 с шагом 0.2 единицы), содержащего 50 мМ фосфата, 100 мМ NaCl, 10% FBS и гибридный или контрольный белок в концентрации 1 мМ. Полученную смесь инкубировали 15 мин при 37°C, затем клетки осаждали центрифугированием 30 с при 1000 g, супернатант удаляли, добавляли 100 мкл PBS и проводили анализ методом проточной цитофлуориметрии с использованием Novocyt 3000 VYB (ACEA Biosciences, США). Обработку полученных данных проводили при помощи программного обеспечения NovoExpress 1.3 (ACEA Biosciences Inc., США). Количество клеток было подобрано так, что после тестирования образца получалось ~20 000 событий. Сначала отбирали события по параметрам FSC-A/SSC-A, а затем по FSC-A/FSC-H, получали гистограммы интенсивности флуоресценции клеток. Для регистрации флуоресценции использовали канал BL1 (лазер возбуждения 488 нм, эмиссионный фильтр 530/30 нм). Для оценки эффективности связывания гибридных белково-пептидных конструкций с клетками использовали отношение значения медианы интенсивности флуоресценции (MFI) к эффективности созревания хромофора EGFP. Для каждой белково-пептидной конструкции анализ проводили в трех повторях. Полученные зависимости MFI от pH аппроксимировали с помощью программы Origin 2021 (OriginLab, США) функцией

$$(F_b + F_a \times 10^{m(pK_a - pH)}) / (1 + 10^{m(pK_a - pH)}) \quad (1)$$

или

$$F_b + (F_a - F_b) [p / (1 + 10^{m_1(pK_{a1} - pH)}) + (1 - p) / (1 + 10^{m_2(pK_{a2} - pH)})], \quad (2)$$

где F_a – кислотная базовая линия, F_b – щелочная базовая линия, p – вклад компоненты с большим влиянием, m – наклон перехода, pK_a – середина кривой.

Флуоресцентная микроскопия. Клетки HeLa высевали в 96-луночный планшет в количестве 10⁴ клеток на лунку в 100 мкл культуральной среды и выращивали в течение ночи. Затем среду удаляли и добавляли EGFP/pHLIPwt или EGFP в концентрации 2 мМ в 100 мкл фосфатного буфера с pH 6.2 или 7.4 (50 мМ фосфата, 100 мМ NaCl и 10% FBS). Клетки инкубировали при 37°C в течение 15 мин, дважды промывали PBS, фиксировали 4%-ным раствором формальдегида в PBS в течение 10 мин. Затем клетки снова промывали PBS и перед микроскопией добавляли флуоресцентную метку Hoechst 33258 (Lumiprobe, Россия) до концентрации 20 нМ для окрашивания ядер. Визуализацию осуществляли при помощи конфокальной системы Zeiss LSM 980 (ZEISS Microscopy, Германия) с использованием объектива 10×. Все изображения были получены при одинаковых условиях съемки и обработки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере белково-пептидных конструкций, состоящих из EGFP и двух вариантов pH-чувствительного пептида (pHLIPwt и pHLIPvar3), было показано влияние линкерной последовательности на функциональные свойства этих конструкций. Полученные конструкции содержали два вида линкеров: IEGRCS (EGFP-IEGRCS-pHLIPwt и EGFP-IEGRCS-pHLIPvar3) и GS (EGFP-GS-pHLIPwt и EGFP-GS-pHLIPvar3), который был использован в нашей предыдущей работе [3]. Было установлено, что конструкции с линкером IEGRCS более эффективно pH-зависимо связываются с клетками HeLa. Также было показано, что слияние EGFP с пептидами pHLIP в некоторой мере влияет на созревание хромофора этого ФБ. Кроме того, было продемонстрировано, что белково-пептидные конструкции, несущие pHLIPwt, более эффективно связываются с мембранами клеток при понижении pH, по сравнению с аналогичными конструкциями с pHLIPvar3.

Таким образом, в данной работе показано, что получение pH-чувствительных конструкций на основе белков и пептидов pHLIP с сохранением их первоначальных функциональных свойств – нетривиальная задача, поскольку на эффективность pH-зависимого связывания может влиять тип

используемого линкера. Кроме того, в результате получения таких белково-пептидных конструкций могут нарушаться функциональные свойства белковой компоненты, о чем свидетельствует изменение эффективности синтеза хромофора ФБ.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00036).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reshetnyak Y.K., Andreev O.A., Lehnert U., Engelman D.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 6460–6465.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0601463103>
2. Svoronos A.A., Bahal R., Pereira M.C. Barrera F.N., Deacon J.C., Bosenberg M., DiMaio D., Glazer P.M., Engelman D.M. // *Mol. Pharm.* 2020. V. 17. P. 461–471.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00883>
3. Frolova A.Yu., Pakhomov A.A., Kakuev D.L., Sungurova A.S., Deyev S.M., Martynov V.I. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022. V. 612. P. 141–146.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.04.112>
4. Adochite R.-C., Moshnikova A., Golijanin J., Andreev O.A., Katenka N.V., Reshetnyak Y.K. // *Mol. Imaging Biol.* 2016. V. 18. P. 686–696.
<https://doi.org/10.1007/s11307-016-0949-6>
5. Reshetnyak Y.K., Moshnikova A., Andreev O.A., Engelman D.M. // *Front Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 8. P. 335.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00335>
6. Dharmaratne N.U., Kaplan A.R., Glazer P.M. // *Cells*. 2021. V. 10. P. 10030541.
<https://doi.org/10.3390/cells10030541>
7. Liu Y.-C., Wang Z.-X., Pan J.-Y., Wang L.-Q., Dai X.-Y., Wu K.-F., Ye X.-W., Xu X.-L. // *Molecules*. 2023. V. 28. P. 2175.
<https://doi.org/10.3390/molecules28052175>
8. Frolova A.Yu., Pakhomov A.A., Kakuev D.L., Sungurova A.S., Dremina A.A., Mamontova E.D., Deyev S.M., Martynov V.I. // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2023. V. 249. P. 112803.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2023.112803>
9. Weerakkody D., Moshnikova A., Thakur M.S., Moshnikova V., Daniels J., Engelman D.M., Andreev O.A., Reshetnyak Y.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 5834–5839.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1303708110>
10. Pakhomov A.A., Frolova A.Yu., Tabakmakher V.M., Chugunov A.O., Efremov R.G., Martynov V.I. // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2020. V. 206. P. 111853.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111853>
11. McRae S.R., Brown C.L., Bushell G.L. // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 41. P. 121–127.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.12.030>

The Influence of Peptide Linkers on Functional Properties of Hybrid Structures with the Selective pH-Dependent Binding to Cancer Cells

A. Yu. Frolova^{*,#}, A. A. Pakhomov^{*}, S. M. Deyev^{*}, and V. I. Martynov^{*}

[#] Phone: +7 (495) 336-51-11; e-mail: anastasiya_frolova_box@mail.ru

^{*} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

Most of the modern cancer therapies are non-specific and have adverse side effects on the body. Nowadays, targeted cancer therapies are being developed, in particular using targeting peptides that selectively bind to cancer cells. The aim of the present work is to explore the prospects of using a peptide pHLIP that binds to cancer cells at decreased pH values, as a part of recombinant protein-peptide construct for cancer diagnosis and targeted therapy. Hybrid structures based on the fluorescent protein EGFP and a linker sequence connecting fluorescent protein to two different pHLIP variants were obtained. The effect of different linkers on the pH-dependent binding of the constructs to cells, as well as on the efficiency of EGFP chromophore synthesis within the hybrid construct was investigated.

Keywords: fluorescent protein, EGFP, pHLIP, targeted cancer therapy, acidosis, theranostics



УДК 577.12

ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТОРОВ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГАЛАКТОНОЛАКТОНОКСИДАЗЫ ИЗ *Trypanosoma cruzi*

© 2024 г. А. А. Чудин*,[#], Е. В. Кудряшова*,[#]

* ФГБОУ ВО “Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”, химический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/3

Поступила в редакцию 04.12.2023 г.

После доработки 15.12.2023 г.

Принята к публикации 16.12.2023 г.

Исследовано влияние структуры эффекторов – 1,4-бензохинона, коферментов Q и их структурных аналогов – на активность галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) и гомологичного фермента L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH). С использованием двух форм AtGALDH – природной (дегидрогеназа) и мутантной (проявляющей оксидазную активность) – выявлена роль 1,4-бензохинона и его аналогов как электроноакцепторов AtGALDH и TcGAL. Установлено, что соединения, содержащие метоксигруппы, являются более эффективными электроноакцепторами для TcGAL (коэнзим Q0, 2,6-диметокси-1,4-бензохинон) по сравнению с соединениями, не обладающими OCH₃-группами (2,5-дигидрокси-1,4-бензохинон). С применением 2,6-диметокси-1,4-бензохинона как электроноакцептора предложен подход к спектрофотометрическому измерению активности TcGAL по изменению поглощения электроноакцептора в отсутствие дополнительных компонентов (красителя, обесцвечивающегося при взаимодействии с продуктом реакции – аскорбатом). Полученные результаты позволяют проводить более целенаправленный поиск ингибиторов TcGAL, что может рассматриваться как основа для разработки селективных лекарственных средств против болезни Шагаса, вызываемой *T. cruzi*.

Ключевые слова: галактонолактонооксидаза, L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа, электроноакцепторы, эффекторы, коэнзимы, 1,4-бензохинон, *Trypanosoma cruzi*

DOI: 10.31857/S0132342324040128, **EDN:** MWKENO

ВВЕДЕНИЕ

Галактонолактонооксидаза из одноклеточного паразита *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) – мембранный фермент, катализирующий финальную стадию биосинтеза витамина С – антиоксиданта, жизненно необходимого *T. cruzi* [1]. Этот микроорганизм не способен потреблять витамин С извне и должен синтезировать его самостоятельно. По этой причине ингибиторы TcGAL рассматриваются нами

как основа для разработки селективных лекарственных средств против болезни Шагаса, вызываемой *T. cruzi*, поскольку организм человека не содержит галактонолактонооксидазу [2].

Следует подчеркнуть, что TcGAL не функционирует в водной среде (не принимает нативную конформацию). Поэтому для изучения TcGAL мы ранее разработали методику, позволяющую сворачивать фермент и измерять его активность, используя

Сокращения: TcGAL – галактонолактонооксидаза из *Trypanosoma cruzi*; AtGALDH – L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа из *Arabidopsis thaliana*; БХ – 1,4-бензохинон; ЭА – электроноакцептор; ФМС – феназинметосульфат; ДХФИФ – 2,6-дихлорфенолиндофенол; АОТ – натриевая соль ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты; CoQ0 – коэнзим Q0; CoQ1 – коэнзим Q1.

[#] Автор для связи: (эл. почта: andrew_18@inbox.ru; Helenakoudriachova@yandex.ru).

систему обращенных мицелл ПАВ (AOT) [3]. Для контроля влияния мицеллярной среды на распределение компонентов реакционной системы и тем самым на каталитическую активность фермента в данной работе использовался гомолог TcGAL – факультативно мембранный фермент L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH), катализирующий ту же реакцию, но проявляющий активность как в мицеллах, так и в воде.

Каталитический цикл AtGALDH и TcGAL состоит из двух полуреакций. В ходе одной из них субстрат (галактонолактон) превращается в продукт (аскорбат), а в ходе другой кофактор флавин (FAD) возвращается в исходное окисленное состояние, отдавая электроны электроноакцептору (ЭА) (рис. 1).

Роль ЭА в случае TcGAL могут играть как кислород, так и другие соединения, т.е. TcGAL обладает одновременно оксидазной и дегидрогеназной активностью [1]. В нашей предыдущей работе [2] мы разработали методику ингибиторного анализа для TcGAL с применением системы обращенных мицелл и выявили ингибиторы терпеноидного ряда (действующие в микромолярных концентрациях). Однако остается неясным, на какую из активностей TcGAL они преимущественно влияют – на дегидрогеназную или оксидазную. Для исследования этого аспекта в данной работе мы изучили влияние ЭА на два типа гомологичного фермента AtGALDH (из растительного источника *A. thaliana*). Так, AtGALDH дикого типа обладает только дегидрогеназной активностью (не может использовать

кислород в качестве ЭА) и представляет собой удобную модель для изучения влияния эффекторов именно на дегидрогеназную активность TcGAL в мицеллярной и водной средах. При этом мутантная форма AtGALDH (замена Ala113Gly [4]) обладает одновременно дегидрогеназной и оксидазной активностью, фермент является аналогом TcGAL, функционирующим как в мицеллах, так и в воде. Перечисленные свойства мутантной формы AtGALDH позволяют использовать ее в качестве контрольной системы при изучении действия ингибиторов, ЭА и других эффекторов в водной и мицеллярной средах.

Природным ЭА для TcGAL и AtGALDH является цитохром *c*, однако он теряет вторичную структуру в обращенных мицеллах [1]. Поэтому цитохром *c* не пригоден для измерения активности TcGAL в мицеллах. Следовательно, в случае мицелл требуются искусственные ЭА, такие как предложенный нами ранее феназинметосульфат (ФМС) [2, 3].

В качестве перспективных ЭА или эффекторов AtGALDH и TcGAL мы рассматриваем 1,4-бензохинон (БХ, рис. 2а) и его аналоги коэнзимы Q [1, 5], поскольку они являются природными ЭА для ряда мембранных ферментов и играют роль переносчиков электронов в дыхательной цепи у различных организмов. Так, мембраны млекопитающих содержат гомологи CoQ_n с длинными изопреновыми цепями: у человека это Q₁₀, у грызунов – преимущественно Q₉ [6]. У бактерий, например, у *E. coli*, присутствует коэнзим Q₈ [7], а у дрожжей (*S. cerevisiae*) имеется более короткий Q₆ [6]. Интересно отметить, что коэнзимы с

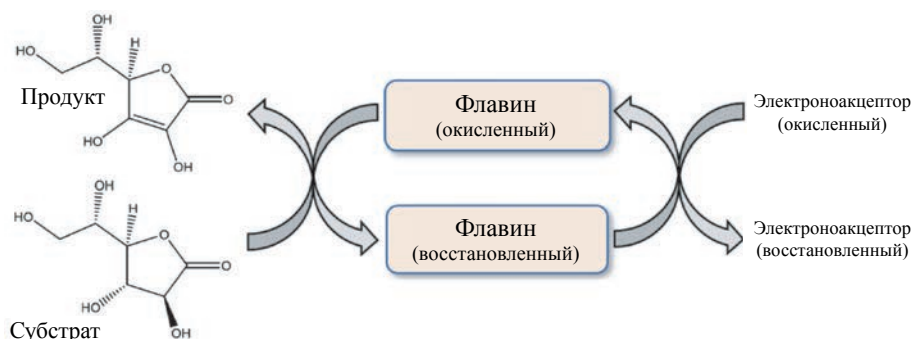


Рис. 1. Каталитический цикл ферментов AtGALDH и TcGAL.

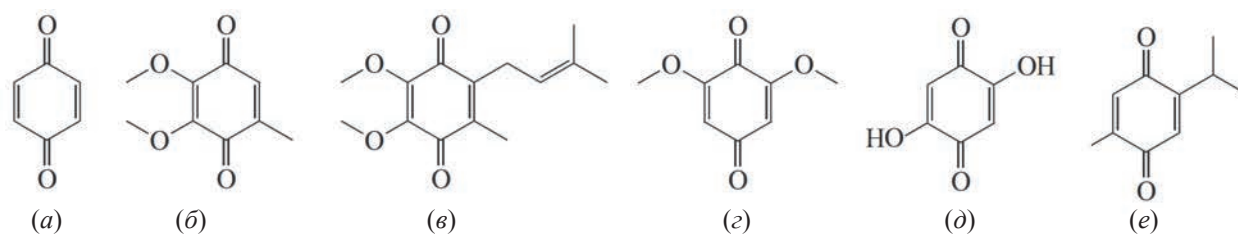


Рис. 2. Структуры 1,4-бензохинона (а) и его аналогов: коэнзима Q0 (б), коэнзима Q1 (в), 2,6-диметокси-1,4-бензохинона (г), 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинона (д) и тимохинона (е).

короткой изопреновой цепью, такие как Q1 и Q2, используются для измерения активности ряда ферментов, таких как сукцинатдегидрогеназа и альтернативная оксидаза, в том числе из трипаносоматид (включая вид *T. brucei*, родственный *T. cruzi*) [8].

В работе мы рассматриваем коэнзимы Q1 и Q0 (CoQ1 и CoQ0), являющиеся структурными аналогами 1,4-бензохинона (БХ). Так, коэнзим CoQ1 отличается от БХ наличием OCH_3 - и CH_3 -групп в бензольном кольце, и, кроме того, CoQ1 имеет изопреновую цепь (рис. 2в). У CoQ0 имеются те же заместители в бензольном кольце, что и у CoQ1, но отсутствует изопреновый фрагмент (рис. 2б).

С точки зрения использования в качестве ЭА для измерения активности AtGALDH и TcGAL (и потенциально других дегидрогеназ) коэнзимы CoQ0 и CoQ1 могут обладать преимуществами по сравнению с ранее исследованным БХ [5, 9]. Так, в шестичленном кольце CoQ1, в отличие от БХ, все атомы водорода замещены на алкильные или метоксигруппы (рис. 2), поэтому CoQ0 и CoQ1 более устойчивы в слабощелочной среде [4], что может способствовать их большей применимости в качестве ЭА для TcGAL с оптимумом активности при pH 8.8.

В литературе высказано предположение о важной роли изопреновой цепи, имеющейся у CoQ1, для электроноакцепторных свойств коэнзимов [10]. Однако согласно нашим данным, коэнзим Q10, обладающий длинной изопреновой цепью (10 звеньев), не является ЭА в случае

AtGALDH, а напротив, оказывает некоторое ингибирующее влияние на фермент [5]. Таким образом, среди коферментов CoQ перспективными представляются CoQ0 и CoQ1 как потенциальные ЭА для TcGAL и AtGALDH.

Помимо коэнзимов, в качестве потенциальных ЭА для TcGAL и AtGALDH можно рассматривать 2,6-диметокси-1,4-бензохинон (рис. 2г), производное 1,4-бензохинона, встречающееся во многих растениях и выступающее в качестве эффективного ЭА таких ферментов, как 1,4-бензохинонредуктаза [11]. Другим перспективным ЭА выступает аналог 2,6-диметокси-1,4-бензохинона – 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинон, отличающийся заменой метоксигрупп на гидроксигруппы и их положением (рис. 2д). Электроноакцепторные свойства 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинона описаны в литературе: например, данное соединение выступает в роли π -акцептора в случае комплекса с переносом заряда, который образуется между 2-амино-4-метокси-6-метилпиримидином и 2,5-дигидрокси-1,4-бензохиноном [12]. Наконец, следует выделить тимохинон (рис. 2е), производное 1,4-бензохинона из растительных источников (можжевельник), являющееся электроноакцептором хиноноксидоредуктазы (NQO-1) [13] и объектом повышенного внимания ученых ввиду своих антидиабетических свойств [14–16].

Таким образом, целью данной работы было исследование влияния структуры потенциальных ЭА или эффекторов (1,4-бензохинона и его структурных аналогов) на активность TcGAL и гомологичного фермента AtGALDH.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние 1,4-бензохинона и его аналогов на дегидрогеназную активность AtGALDH.

Для изучения влияния БХ и его производных на дегидрогеназную составляющую TcGAL мы использовали природную форму гомологичного фермента AtGALDH, обладающего только дегидрогеназной активностью. Измерение активности AtGALDH в присутствии каждого потенциального ЭА проводили спектрофотометрически с использованием красителя ДХФИФ, который обесцвечивается при взаимодействии с продуктом реакции – аскорбатом [3].

Полученные зависимости максимальной активности AtGALDH от структуры используемого ЭА в водной и мицеллярной средах представлены на рис. 3. В качестве контроля на рис. 3 приведена активность AtGALDH в присутствии ФМС и красителя ДХФИФ (2,6-дихлорфенолиндофенол), которые использовали в качестве базисной системы в наших предыдущих работах [2, 3, 5].

Обнаружено, что в водной среде 2,6-диметокси-БХ и СоQ0 обеспечивают в 4–5 раз большую активность ($V_{\text{макс}}$) AtGALDH по сравнению с ранее исследованными БХ и СоQ1 [5] (табл. 1). При этом в мицеллярной среде 2,6-диметокси-БХ позволяет достичь более высокого значения $V_{\text{макс}}$ по сравнению с таковым для БХ и СоQ1 (табл. 1).

Отметим, что в обеих средах (водной и мицеллярной) 2,6-диметокси-БХ и СоQ эффективны при низких концентрациях (~ 0.02 – 10 мкМ), в то время как БХ и СоQ1 действуют лишь при концентрациях ~ 2 мМ. Следует учесть и другие ограничения при использовании БХ и СоQ1 как ЭА. Так, при измерении активности AtGALDH по изменению поглощения самого БХ или СоQ1 значительный вклад вносит фоновый сигнал. Кроме того, БХ подвержен окислению в слабощелочной среде при pH-оптимуме фермента в водной и мицеллярной средах [9, 5]. В отличие от БХ и СоQ1, комбинации 2,6-диметокси-БХ и СоQ0 с красителем практически не проявляют фонового сигнала ($< 5\%$ от целевого) и функционируют при pH-оптимуме AtGALDH (pH 8.8) (табл. 1).

Наконец, использование 2,6-диметокси-БХ и СоQ0 показывает преимущества не только по сравнению с БХ и СоQ1, но и по сравнению с разработанной нами ранее методикой с использованием ФМС как ЭА [3]. Так, в водной среде максимальная скорость ($V_{\text{макс}}$) в присутствии 2,6-диметокси-БХ или СоQ0 выше в 2 раза по сравнению с ФМС, а в мицеллярной – сопоставима (рис. 3). При этом используемые концентрации 2,6-диметокси-БХ и СоQ0 (0.02 – 10 мкМ) на несколько порядков ниже таковой для ФМС (120 мкМ [3]).

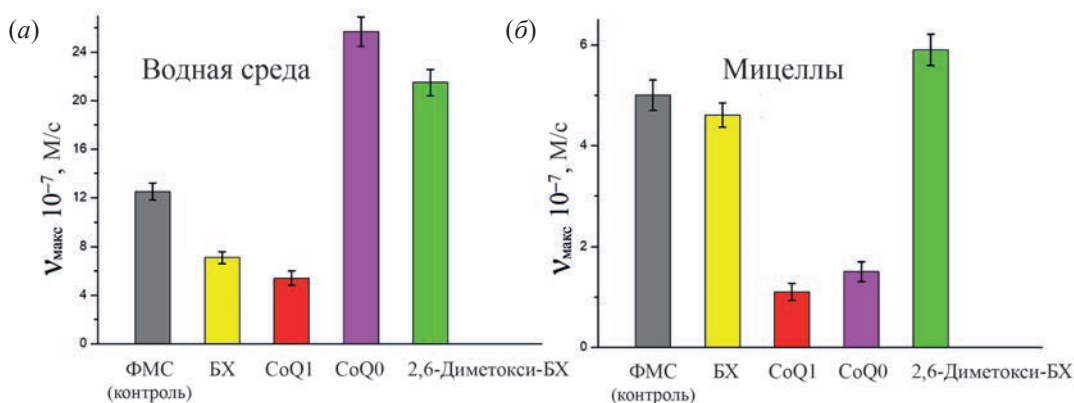


Рис. 3. Максимальная активность природной формы AtGALDH в водной (натрий-фосфатный буфер) (a) и в мицеллярной (0.1 М АОТ в *n*-октане, $W_0 = 22$) (б) средах в зависимости от структуры ЭА в присутствии красителя ДХФИФ. Концентрации: субстрат (1 мМ), ДХФИФ (120 мкМ), AtGALDH (6 нМ). Концентрации ЭА, при которых наблюдалась максимальная активность фермента, указаны в табл. 1.

Таблица 1. Каталитические характеристики 1,4-бензохинона и его аналогов как электроноакцепторов природной формы AtGALDH

Электроноакцептор	AtGALDH (природная форма)							
	Водно-буферный раствор				Мицеллы			
	$V_{\text{макс}}^{**}$, 10^{-7} М/с	фоновый сигнал ** , 10^{-7} М/с	pH- оптимум	$[\text{ЭА}]_{\text{насыщ}}$, мкМ	$V_{\text{макс}}^{**}$, 10^{-7} М/с	фоновый сигнал ** , 10^{-7} М/с	pH- оптимум	$[\text{ЭА}]_{\text{насыщ}}$, мкМ
CoQ ₀	25.7	—	8.8	0.016	1.6	—	8.8	0.9
2,6-Диметокси-БХ	21.5	—	8.8	2.3	13.5	—	8.8	14
БХ*	7.1	1.0	7.8	4 000	4.6	0.8	7.8	2 000
CoQ1*	5.4	0.5	7.8	4 000	1.1	0.4	7.8	2 000
ФМС	12.5	—	8.8	120	5.0	—	8.8	120

Примечание: $V_{\text{макс}}$ – максимальная активность фермента; $[\text{ЭА}]_{\text{насыщ}}$ – концентрация ЭА, при которой наблюдается $V_{\text{макс}}$.

* Данные для БХ и CoQ1 приведены из работы [5].

** Погрешность измерения каталитической активности не превышает 10%.

Учитывая гомологичность AtGALDH и TcGAL, а также наилучшие параметры для 2,6-диметокси-БХ как ЭА в мицеллах для дегидрогеназы AtGALDH, можно предположить, что 2,6-диметокси-БХ как ЭА будет наиболее эффективен и для TcGAL. Однако, как упоминалось выше, TcGAL обладает одновременно дегидрогеназной и оксидазной активностями, а дикий тип AtGALDH – только дегидрогеназной. Мутантная форма AtGALDH (замена Ala113Gly [4]), как и сам TcGAL, обладает обоими типами активности, что позволяет определить степень влияния ЭА на дегидрогеназную активность по отношению к оксидазной. Кроме того, поскольку AtGALDH функционирует не только в мицеллах, но и в водном растворе, с использованием мутантного типа AtGALDH мы можем изучить роль среды (мицеллы или вода) на свойства эффекторов в отношении целевого TcGAL, функционирующего только в мицеллах.

Влияние 1,4-бензохинона и его аналогов на активность мутантной формы AtGALDH. Для изучения действия эффекторов (1,4-бензохинона и его производных) на мутантную форму AtGALDH (замена Ala113Gly [4]) использовали методику с применением красителя ДХФИФ – проявителя продукта реакции (аскорбата) [3]. Действие таких эффекторов продемонстрировано на рис. 4.

В отличие от AtGALDH дикого типа, в водной среде наиболее сильное воздействие оказывает

БХ, усиливающий активность мутантной формы AtGALDH в 3 раза по сравнению с контролем (без ЭА) (рис. 4). В меньшей степени на активность AtGALDH влияют CoQ₀ и 2,6-диметокси-БХ (усиление активности AtGALDH в 2 раза) и CoQ1 (усиление всего на 20%).

В случае мицелл драматическое воздействие оказывает 2,6-диметокси-БХ, усиливающий активность мутантной формы AtGALDH в 10 раз. В то же время остальные соединения усиливают активность фермента лишь в ~2 раза. Каталитические характеристики исследуемых эффекторов в отношении мутантной формы AtGALDH представлены в табл. 2.

Сравнивая результаты, полученные для дикой и мутантной форм AtGALDH, следует подчеркнуть, что в мицеллах обе формы наиболее активны в присутствии 2,6-диметокси-БХ (его влияние на оксидазную активность более выражено, чем на дегидрогеназную). Это позволяет предположить, что и в случае гомологичного TcGAL наибольшая активность должна наблюдаться для 2,6-диметокси-БХ. Кроме того, для TcGAL в качестве ЭА перспективен CoQ₀, работающий при pH-оптимуме обоих ферментов (pH 8.8), в отличие от БХ и CoQ1.

Влияние 2,6-диметокси-БХ и его аналогов на активность TcGAL. Поскольку БХ и CoQ1 не оптимальны для определения активности фермента (показывают слишком высокую фо-

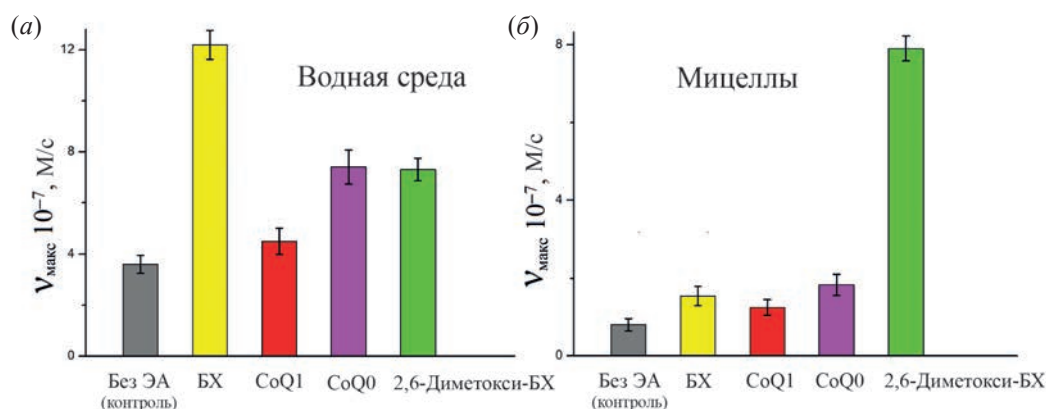


Рис. 4. Максимальная активность мутантной формы AtGALDH в водной (натрий-фосфатный буфер, pH 8.8 для CoQ0 и 2,6-диметокси-БХ и pH 7.8 для CoQ1 и БХ) (а) и мицеллярной (0.1 М АОТ в *n*-октане, pH 8.8 для CoQ0 и 2,6-диметокси-БХ и pH 7.8 для CoQ1 и БХ, $W_0 = 22$) (б) средах в зависимости от структуры ЭА в сочетании с красителем ДХФИФ. Концентрации: субстрат (1 мМ), ДХФИФ (120 мкМ), AtGALDH (6 нМ). Для сравнения указана активность без добавления ЭА.

Таблица 2. Каталитические характеристики эффекторов мутантной формы AtGALDH – 1,4-бензохинона и его аналогов

Эффектор	AtGALDH (мутантная форма, Ala113Gly)							
	водно-буферный раствор				мицеллы			
	C_{50} , мкМ	$V_{\max}^*$, 10^{-7} M/c	pH	$[\text{ЭА}]_{\text{насыщ}}$, мкМ	C_{50} , мкМ	$V_{\max}^*$, 10^{-7} M/c	pH	$[\text{ЭА}]_{\text{насыщ}}$, мкМ
БХ	0.5	13	7.8	12.8	1.5	1.4	7.8	20
Q1	5.0	5	7.8	20	3.8	1.3	7.8	10
2,6-ОСН ₃ -БХ	0.4	7.3	8.8	2.1	4.8	7.9	8.8	12
Q0	0.006	7.4	8.8	0.12	0.17	2.1	8.8	0.5

Примечание: C_{50} – концентрация эффектора, вызывающая увеличение активности фермента в 2 раза по сравнению с активностью в отсутствие эффектора; $V_{\max}$ – максимальная активность фермента; $[\text{ЭА}]_{\text{насыщ}}$ – концентрация ЭА, при которой наблюдается $V_{\max}$.

* Погрешность измерения каталитической активности не превышает 10%.

новую реакцию) при pH-оптимуме TcGAL [5] и оказывают слабое влияние на аналог TcGAL – мутантную форму AtGALDH, то представляется целесообразным изучить действие других производных БХ – 2,6-диметокси-БХ, CoQ1 и тимохинона – на активность TcGAL. Кроме того, интересно изучить влияние замены метокси-групп на гидроксигруппы, имеющиеся, например, у 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинона, электроноакцепторные свойства которого описаны в литературе (является π -акцептором в случае комплекса с переносом заряда [12]). Полученные зависимости максимальной активности TcGAL от

структуры вышеперечисленных потенциальных ЭА в комбинации с красителем представлены на рис. 5.

Примечательно, что CoQ0 и 2,6-диметокси-БХ в случае TcGAL показывают тенденции, аналогичные наблюдаемым для обеих форм гомологичного AtGALDH в мицеллах (рис. 3–5). Так, CoQ0 функционирует при концентрациях на 1–3 порядка меньше, чем другие ЭА, а наибольшее значение максимальной активности наблюдается в случае 2,6-диметокси-БХ (рис. 5). Отдельно следует отметить тимохинон, который не является ЭА для TcGAL, а напротив, оказывает слабое

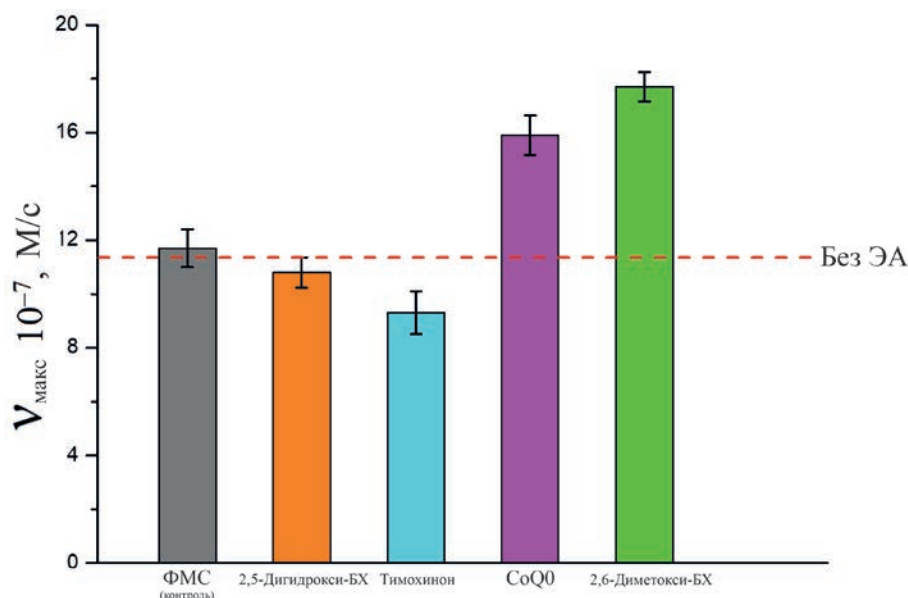


Рис. 5. Зависимость максимальной активности TcGAL в мицеллярной среде (0.1 М АОТ в *n*-октане, pH 8.8, $W_0 = 22$) от структуры эффектора (электроноакцептора) в сочетании с красителем ДХФИФ. Концентрации субстрата (1 мМ), ДХФИФ (120 мкМ) и TcGAL (34 нМ) поддерживались постоянными. Для сравнения показана активность TcGAL в присутствии 120 мкМ ФМС по ранее опубликованным данным [3]. Концентрации эффекторов (электроноакцепторов), при которых наблюдалась максимальная активность фермента: 2,5-дигидрокси-БХ (360 мкМ), тимохинон (200 мкМ), CoQ0 (0.72 мкМ), 2,6-диметокси-БХ (24 мкМ). Концентрация ФМС в контрольных измерениях – 120 мкМ.

ингибирующее действие (20%-ное ингибирование при 200 мкМ тимохинона).

Таким образом, наиболее эффективным ЭА среди изучаемых соединений оказался 2,6-диметокси-БХ при невыраженной фоновой реакции (< 5% от целевой). Столь высокая эффективность 2,6-диметокси-БХ как ЭА позволила нам предположить, что за ходом реакции можно следить и в отсутствие красителя (ДХФИФ), если 2,6-диметокси-БХ обладает достаточной разницей коэффициентов молярного поглощения окисленной и восстановленной форм.

Разработка подхода к измерению активности TcGAL без красителя с применением 2,6-диметокси-1,4-бензохинона в качестве электроноакцептора. Использование в мицеллах дополнительных реагентов, в том числе красителя ДХФИФ, желательно сводить к минимуму ввиду ограниченного объема водной фазы и возможного влияния красителя на другие компоненты системы. Установив, что 2,6-диметокси-БХ – наиболее эффективный потенциальный ЭА для TcGAL,

мы исследовали возможность применения данного ЭА для определения активности TcGAL без использования красителя (ДХФИФ). Спектры окисленной и восстановленных форм 2,6-диметокси-БХ имеют наибольшую разницу в поглощении при длине волны 285 и 287 нм в водном растворе и в мицеллах соответственно (рис. 6).

Спектры поглощения реакционной смеси (содержащей все необходимые компоненты) до и после реакции (рис. 6в) также имеют вид, аналогичный спектрам окисленной и восстановленной форм 2,6-диметокси-БХ в водной и мицеллярной средах (рис. 6а, 6б). Это свидетельствует о том, что 2,6-диметокси-БХ расходуется в ходе реакции, т.е. является именно ЭА для TcGAL, а не, например, аллостерическим эффектором.

Варьируя концентрацию 2,6-диметокси-БХ в водной и мицеллярной средах, мы определили коэффициенты молярного поглощения окисленной и восстановленной форм 2,6-диметокси-БХ и их

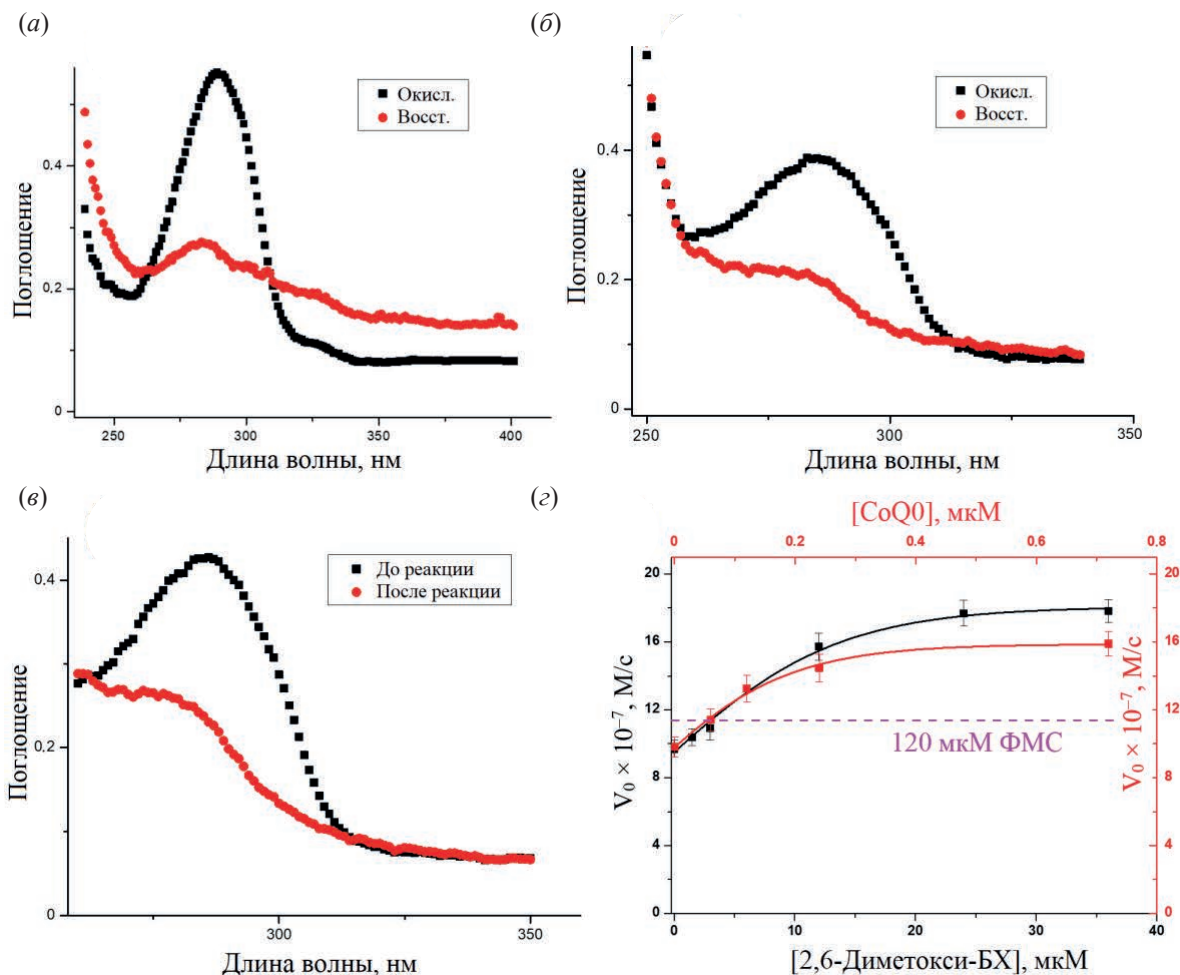


Рис. 6. (а) – Спектры окисленной и восстановленной форм 24 мкМ 2,6-диметокси-БХ в натрий-фосфатном буфере, рН 8.8); (б) – спектры окисленной и восстановленной форм 24 мкМ 2,6-диметокси-БХ в мицеллярной среде (0.1 М АОТ в *n*-октане, $W_0 = 22$, рН 8.8); (в) – спектры реакционной смеси (1 мМ D-арабиноно-1,4-лактон, 24 мкМ 2,6-диметокси-БХ) в мицеллярной среде (0.1 М АОТ в *n*-октане, $W_0 = 22$) до и после протекания реакции (добавления 34 нМ ТсГАЛ); (г) – зависимость активности ТсГАЛ от концентрации 2,6-диметокси-БХ (без красителя) и от концентрации СоQ0 (в комбинации с 120 мкМ ДХФИФ), в качестве базовой линии указана активность ТсГАЛ при комбинации 120 мкМ ФМС и 120 мкМ ДХФИФ.

разницу ($\epsilon_{\text{окисл}} - \epsilon_{\text{восст}}$) (табл. 3), которая составляет 13 900 (для водного раствора) и 4 600 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (для мицеллярной системы). Большее значение параметра $\epsilon_{\text{окисл}} - \epsilon_{\text{восст}}$ в мицеллярной среде по сравнению с незамещенным БХ и ФМС с разностными коэффициентами поглощения 3050 и 2100 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ соответственно [3] говорит о возможности применения 2,6-диметокси-БХ для измерения активности ТсГАЛ по расходу ЭА в процессе реакции.

Используя найденное значение $\epsilon_{\text{окисл}} - \epsilon_{\text{восст}} = 4\,600 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (табл. 3), мы определили макси-

мальную активность ТсГАЛ в присутствии 24 мкМ (в насыщении по 2,6-диметокси-БХ, рис. 6г). Оказалось, что найденное значение ($17.8 \times 10^{-7} \text{ M/s}$) в 1.5 раза выше активности в случае комбинации ФМС и красителя (контрольной системы), использовавшейся нами ранее для изучения ТсГАЛ [2, 3]. Следовательно, 2,6-диметокси-БХ – эффективный ЭА для ТсГАЛ, позволяющий надежно регистрировать активность ТсГАЛ.

Таким образом, разработан улучшенный подход к измерению активности ТсГАЛ с использованием 2,6-диметокси-БХ (24 мкМ) в ка-

Таблица 3. Спектрофотометрические параметры 2,6-диметокси-БХ в водной (PBS, pH 8.8) и мицелярной (0.1 М АОТ в октане, $W_0 = 22$) средах

Среда	Длина волны, нм	$\epsilon_{\text{окисл}}, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{восст}}, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{окисл}} - \text{восст}, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
Вода	285	22 600	8 700	13 900
Мицеллы	287	9 200	4 600	4 600

честве ЭА, который не требует использования дополнительных агентов (красителя).

Ингибиторный анализ TcGAL с применением 2,6-диметокси-1,4-бензохинона в качестве электроноакцептора. В наших предыдущих работах было продемонстрировано применение методики измерения активности TcGAL с использованием комбинации ФМС и красителя ДХФИФ для ингибиторного анализа TcGAL [2, 3]. В настоящей работе мы изучили возможность применения подхода с использованием 2,6-диметокси-БХ как ЭА (в отсутствие красителя) для ингибиторного анализа TcGAL. Для этого изучили действие двух соединений, аллилбензола и аллилтетраметоксибензола, которые проявляли ингибирующий эффект в отношении TcGAL в случае методики, разработанной нами ранее, с

ФМС и красителем ДХФИФ [2] (рис. 7). Для оценки эффективности обоих ингибиторов в случае 2,6-диметокси-БХ была выбрана концентрация 200 мкМ, соответствующая максимальному эффекту обоих соединений в случае системы, содержащей ФМС и краситель [2].

Оказалось, что ингибирующий эффект при использовании 2,6-диметокси-БХ как ЭА действительно наблюдался, как и в случае ранее использованной методики с применением ФМС и красителя [2]. Эффективность изученных ингибиторов коррелирует для ФМС и 2,6-диметокси-БХ, а также для системы, содержащей CoQ0 как ЭА и краситель ДХФИФ (рис. 7). Следовательно, использование 2,6-диметокси-БХ в отсутствие красителя позволяет надежно регистрировать ингибирование TcGAL.

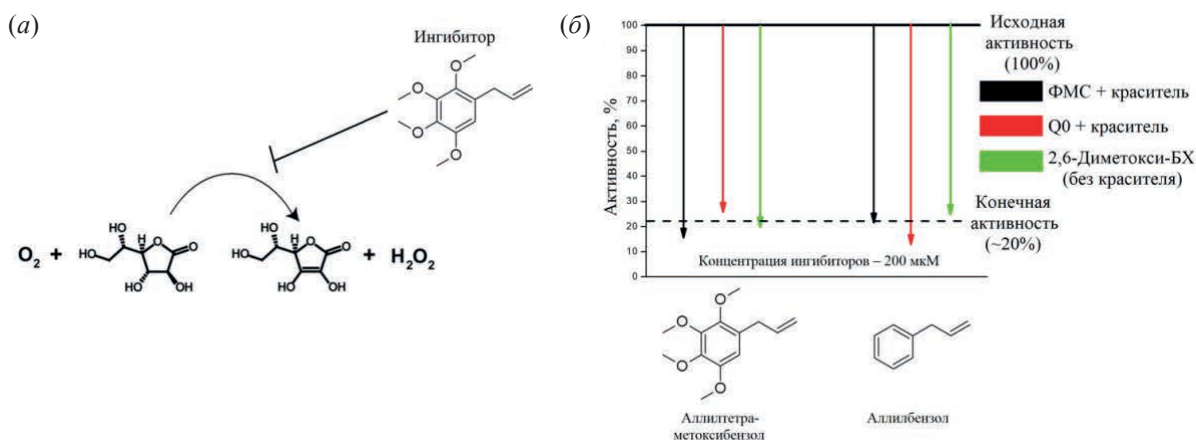


Рис. 7. (а) – Схема ингибирования целевой реакции; (б) – сравнение ингибирующего эффекта аллилтетраметоксибензола и аллилбензола для краситель-содержащих систем (комбинация красителя ДХФИФ и ФМС или Q0 как ЭА) и системы без красителя (2,6-диметокси-БХ как ЭА). Концентрации веществ: 120 мкМ ДХФИФ, 1 мМ АР (субстрат), 34 нМ TcGAL, 24 мкМ 2,6-диметокси-БХ, 120 мкМ ФМС и 0.72 мкМ Q0, 200 мкМ аллилтетраметоксибензола и 200 мкМ аллилбензола. Среда: 0.1 М АОТ в *n*-октане, $W_0 = 22$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использовали L-галактоно-1,4-лактон, D-арабиноно-1,4-лактон, 2,6-дихлорфенолиндифенол, натриевую соль ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты (АОТ), коэнзим Q1, коэнзим Q0, 2,6-диметокси-1,4-бензохинон, 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинон, *n*-октан, ацетонитрил (Sigma-Aldrich, США); феназинметосульфат и 1,4-бензохинон (Merck, Германия); аллилтетраметоксибензол и аллилбензол (Acros Organics, Бельгия). L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа из *Arabidopsis thaliana* была любезно предоставлена проф. W.J.H. van Berkel (Вагенингенский университет, Вагенинген, Нидерланды).

Получение рекомбинантных белков AtGALDH и TcGAL, рефолдинг телец включения TcGAL. Экспрессию рекомбинантных белков AtGALDH (EC 1.3.2.3) и TcGAL (EC 1.3.3.12) в *E. coli* проводили согласно методике, описанной ранее [1, 9]. AtGALDH-His6 экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3) в виде растворимого цитоплазматического белка. Для продукции фермента TcGAL использовали клетки *E. coli* BL21 (DE3), несущие плазмиду pBAD-TcGAL. TcGAL формировал нерастворимые тельца включения. Рефолдинг TcGAL проводили согласно методике, описанной нами ранее [1]. Суспензию телец включения, собранных после лизиса клеток, промывали 6%-ным раствором Triton X-100, содержащим 60 мМ ЭДТА и 1.5 М NaCl (pH 7.0), и растворяли в 6 М гуанидинхлориде. Затем гуанидинхлорид удаляли диализом против 10 мМ фосфата натрия (pH 8.0). После диализа суспензию агрегированного фермента вносили в систему обращенных мицелл вода–АОТ–октан. Растворы окисленного и восстановленного глутатиона (10 мМ GSSG и 30 мМ GSH) в 10 мМ фосфате натрия (pH 8.0) смешивали, аликвоту (10 мкл) добавляли к 1 мл мицеллярного раствора фермента в 0.4 М АОТ. Рефолдинг фермента инициировали добавлением 10 мкл раствора FAD в воде (10-кратный молярный избыток по отношению к ферменту). Сворачивание и конечную концентрацию фермента в мицеллах контролировали методом КД-спектроскопии с

использованием КД-спектрометра J-815 (Jasco, Япония).

Каталитическая активность AtGALDH и TcGAL. Для спектрофотометрического определения активности обоих ферментов использовали систему обращенных мицелл ПАВ, 0.1 М АОТ в *n*-октане (степень гидратации $W_0 = 22$), описанную нами ранее [3], с небольшими изменениями. Для измерения активности ферментов использовали комбинацию одного из потенциальных ЭА (1,4-бензохинон или его производные) и 120 мкМ водный раствор ДХФИФ в качестве красителя, обесцвечивающегося при образовании продукта реакции при длине волны 550 нм. Запасные растворы ЭА (CoQ0, CoQ1, 2,6-диметокси-1,4-бензохинона и 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинона) готовили в DMSO. Поглощение измеряли с помощью спектрофотометра Ultrospec-2100pro (Amersham Biosciences, США). В качестве субстратов использовали L-галактоно-1,4-лактон в случае AtGALDH и D-арабиноно-1,4-лактон в случае TcGAL. Концентрации субстратов составляли 1 мМ, ферментов TcGAL (34 нМ) и AtGALDH (6 нМ). Для построения графиков и статистической обработки данных с использованием *t*-критерия Стьюдента применяли программу SigmaPlot 11.1. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

Ингибиторный анализ TcGAL. При разработке подхода к ингибиторному анализу использовали ЭА без красителя, добавляя один из исследуемых ингибиторов (аллилбензол или тетраметоксиаллилбензол) в реакционную среду. В качестве контрольной системы использовали систему, содержащую 120 мкМ ФМС и 120 мкМ ДХФИФ, описанную нами ранее [2]. Эффективность ингибиторов при использовании предлагаемого подхода в сравнении с методикой с применением красителя оценивали по ингибирующему эффекту при насыщающих концентрациях ингибиторов (200 мкМ).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружены новые ЭА для TcGAL ряда 1,4-бензохинона (конзимы Q0, Q1, 2,5-дигидрокси-БХ

и 2,6-диметокси-БХ) и выявлено влияние структуры ЭА на активность TcGAL. Так, установлено, что соединения, содержащие метоксигруппы, являются более эффективными электроноакцепторами для TcGAL (коэнзим Q0, 2,6-диметокси-БХ) по сравнению с соединениями, не имеющими ОСН₃-групп (2,5-дигидрокси-БХ, а также тимохинон, являющийся слабым ингибитором TcGAL).

При исследовании двух форм AtGALDH (природной и мутантной) обнаружено, что в водной среде более “чувствительна” (наибольшая разница в значениях активности) к выбору эффектора природная (дегидрогеназная) форма. В то же время в мицеллах более чувствительна мутантная форма AtGALDH (сочетание дегидрогеназной и оксидазной активности), активность которой более резко возрастает при использовании 2,6-диметокси-БХ. По-видимому, и в случае трипаносомального фермента TcGAL, функционирующего в мицеллах, 2,6-диметокси-БХ оказывает влияние на оба типа активности (дегидрогеназную и оксидазную).

С применением 2,6-диметокси-БХ в качестве ЭА разработан новый подход к измерению активности TcGAL, обладающий преимуществами по сравнению с ранее предложенным подходом [3]. Так, новый подход не требует применения красителя и, кроме того, обеспечивает в 1.5 раза большую активность фермента при меньшей (в 5 раз) концентрации ЭА. Продемонстрирована возможность использования нового подхода для ингибиторного анализа TcGAL. Это еще один шаг в поиске ингибиторов данного фермента, которые могут рассматриваться в качестве основы для разработки лекарственных средств против болезни Шагаса, вызываемой *T. cruzi* [2].

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования (КД-спектрометр J-815, Jasco, Япония) по программе развития МГУ им. М.В. Ломоносова.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kudryashova E.V., Leferink N.G.H., Slot I.G.M., Van Berkel W.J.H. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2011. V. 1814. P. 545–552.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.03.001>
2. Chudin A.A., Zlotnikov I.D., Krylov S.S., Semenov V.V., Kudryashova E.V. // *Biochemistry (Moscow)*. 2023. V. 88. P. 131–141.
<https://doi.org/10.31857/S0320972523010074>
3. Chudin A.A., Kudryashova E.V. // *Analytica*. 2022. V. 3. P. 36–53.
<https://doi.org/10.3390/analytica3010004>
4. Leferink N.G.H., Fraaije M.W., Joosten H.J., Schaap P.J., Mattevi A., van Berkel W.J.H. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 4392–4397.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M808202200>
5. Чудин А.А., Кудряшова Е.В. // *Биотехнология*. 2022. Т. 38. С. 80–85.
<https://doi.org/10.56304/S0234275822040068>
6. Hiji A.K., Kébir H., Hekimi S. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 41013–41018.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M305034200>
7. Hernández-Camacho J.D., García-Corzo L., Fernández-Ayala D.J.M., López-Lluch G., Navas P. // *Antioxidants*. 2021. V. 10. P. 1785.
<https://doi.org/10.3390/antiox10111785>
8. Čermáková P., Kovalinka T., Ferenczyová K., Horváth A. // *Parasite*. 2019. V. 26. P. 17.
<https://doi.org/10.1051/parasite/2019017>
9. Leferink N.G.H., Van Den Berg W.A.M., Van Berkel W.J.H. // *FEBS J.* 2008. V. 275. P. 713–726.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06233.x>
10. Ameixa J., Arthur-Baidoo E., Pereira-da-Silva J., Onćák M., Ruivo J. C., Varella M. T.do N., Ferreira da Silva F., Denifl S. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2023. V. 21. P. 346–353.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.12.011>
11. Laskowski M.J., Dreher K.A., Gehring M.A., Abel S., Gensler A.L., Sussex I.M. // *Plant Physiol.* 2002. V. 128. P. 578–590.
<https://doi.org/10.1104/pp.010581>
12. Alghanmi R.M. // *J. Chem.* 2019. V. 2019. 1743147.
<https://doi.org/10.1155/2019/1743147>

13. Detremmerie C., Vanhoutte P.M., Leung S. // Acta Pharm. Sin. B. 2017. V. 7. P. 401–408.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.06.003>
14. Manal A.A. // Am. J. Life Sci. 2017. V. 5. P. 52–56.
<https://doi.org/10.11648/j.ajls.20170502.13>
15. Gray J.P., Burgos D.Z., Yuan T., Seeram N., Rebar R., Follmer R., Heart E.A. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2016. V. 310. P. E394–E404.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00250.2015>
16. Shaikat A., Zaidi A., Anwar H., Kizilbash N. // Front. Nutr. 2023. V. 10. P. 10:1126272.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1126272>

Impact of Effectors on the Catalytic Activity of Galactonolactone Oxidase from *Trypanosoma cruzi*

A. A. Chudin^{*,#} and E. V. Kudryashova^{*,#}

[#] E-mail: andrew_18@inbox.ru; Helenakoudriachova@yandex.ru

^{*} Chemical Department, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie gory 1/3, Moscow, 119991 Russia

The influence of the structure of the effectors, 1,4-benzoquinone, coenzymes Q and their structural analogues, on the activity of galactonolactone oxidase from *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) and the homologous enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH) was studied. Using two forms of AtGALDH, natural (dehydrogenase) and mutant (exhibiting oxidase activity), the role of 1,4-benzoquinone and its analogs as electron acceptors of AtGALDH and TcGAL was revealed. It has been established that compounds containing methoxy groups are more effective electron acceptors for TcGAL (coenzyme Q0, 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone) compared to compounds without OCH₃ groups (2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone). Using 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone as an electron acceptor, an approach to the spectrophotometric measurement of TcGAL activity by changes in the absorption of the electron acceptor in the absence of additional components (a dye that becomes colorless when interacting with the reaction product, ascorbate) is proposed. The results obtained allow for a more targeted search for TcGAL inhibitors, which can be considered as the basis for the development of selective drugs against Chagas disease caused by *T. cruzi*.

Keywords: galactonolactone oxidase, L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, electron acceptors, effectors, coenzymes, 1,4-benzoquinone, *Trypanosoma cruzi*



УДК 577.181:577.112.6

СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ. V. ГИСТИДИН-СОДЕРЖАЩИЕ АНТИГРИБКОВЫЕ ПЕПТИДЫ С “ЛИНЕЙНЫМ” ТИПОМ АМФИПАТИЧНОСТИ

© 2024 г. Н. В. Амирханов*,[#], А. В. Бардашева*, В. Н. Сильников*, Н. В. Тикунова** ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины” СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 07.11.2023 г.

После доработки 18.11.2023 г.

Принята к публикации 19.11.2023 г.

Синтезирован и исследован ряд гистидин-содержащих синтетических антигрибковых пептидов с “линейным” типом амфипатичности (САМП-ЛТА) (**F2Hx**, **H10F2**, **H10**, где $x = 7, 10, 13$ и 16), проведен скрининг антигрибковой и гемолитической активности этих гистидин-содержащих пептидов. Показано, что представленные гистидин-содержащие САМП-ЛТА способны эффективно подавлять рост условно-патогенных грибов *Candida albicans* и обладают низкой гемолитической активностью, в большинстве случаев не превышающей 10% даже при их относительно высокой (400 мкМ) концентрации в среде, содержащей эритроциты. Антигрибковая активность исследованных САМП-ЛТА возрастает с увеличением количества остатков гистидинов в их составе, достигая максимального значения для гистидин-содержащего пептида **F2H16** (МПК₅₀ = 1.0 мкМ). Показано, что с увеличением длины цепи пептидов растет также их гемолитическая токсичность. В плане терапевтической значимости оптимальными в представленном ряду пептидов оказались САМП-ЛТА **F2H10** и **F2H13**, обладающие более высокой селективностью, чем короткие или более протяженные их аналоги **F2H7** или **F2H16**. Значения терапевтического индекса (ТИ) для этих пептидов составили 233, 247, 79 и 60 соответственно. Показано, что гистидин-содержащие производные САМП-ЛТА с остатками фенилаланина на N-конце пептида (**F2H10**) проявляют меньшую эффективность по сравнению с аналогичными пептидами (**H10F2**), содержащими остатки фенилаланина на C-конце. Среди исследованных пептидов наиболее активным оказался пептид **H10** (МПК₅₀ = 0.7 мкМ), не содержащий остатков фенилаланина, который по своей антигрибковой активности не только эффективнее всех остальных гистидин-содержащих пептидов, в том числе и пептида **F2H16** с 16 остатками гистидина, но и в 4–5 раз эффективнее антигрибкового пептида **P113** (МПК₅₀ = 3.4 мкМ) короткого активного фрагмента природного Hst 5, хорошо известного из литературы. Благодаря своей относительно низкой гемолитической и высокой антигрибковой активности, представленные гистидин-содержащие САМП-ЛТА обладают относительно высокими значениями ТИ (ТИ > 60). Среди всех исследованных пептидов **H10** и **P113** обладают минимальными (практически нулевыми) значениями гемолитической активности. Однако вследствие своей более высокой антигрибковой активности селективность пептида **H10** (ТИ > 1400) превышает селективность пептида **P113** (ТИ > 340) более чем в 4 раза. Таким образом, пептид **H10** благодаря его высокой антигрибковой активности, низкой гемолитической токсичности и, соответственно, высокой терапевтической значимости может использоваться в качестве перспективного антигрибкового пептидного препарата.

Ключевые слова: синтетические антимикробные пептиды, амфифильность, “линейный” тип амфипатичности, “круговой” тип амфипатичности, гистидин-содержащие пептиды, пептид P113, антигрибковая активность, *Candida albicans*, гемолитическая активность, селективность

DOI: 10.31857/S0132342324040135, EDN: MWISGO

Сокращения: АМП – антимикробные пептиды; ГА – гемолитическая активность; КТА – “круговой” тип амфипатичности; ЛТА – “линейный” тип амфипатичности; МГК – минимальная гемолитическая концентрация (концентрация пептида, которая вызывает лизис не более 4% свежих красных кровяных клеток); МПК₅₀ – минимальная подавляющая концентрация (концентрация пептида, при которой рост микроорганизмов подавляется на 50%); АГА – антигрибковая активность; САМП – синтетические антимикробные пептиды; ТИ – терапевтический индекс; ХГ – хлоргексидин; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; NATU – 2-(1H-7-азабензотриазол-1-ил)-1,3,3-тетраметилурионийгексафторфосфат; Hst – гистатин; PBS – фосфатно-солевой буфер; TFA – трифторуксусная кислота.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-51-35; эл. почта: nariman@niboch.nsc.ru).

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия отмечается рост заболеваемости пациентов внутрибольничными грибковыми инфекциями. Дрожжеподобные грибки рода *Candida* – одни из наиболее распространенных возбудителей нозокомиальных (внутрибольничных) инфекций кровотока [1, 2]. Длительное применение в терапии микозов различных антигрибковых средств привело к серьезной угрозе возникновения и распространения патогенных штаммов грибов, обладающих лекарственной устойчивостью к традиционно используемым препаратам [3, 4]. Поэтому важное практическое значение имеет поиск новых лекарственных средств, применение которых не приводило бы к возникновению устойчивости к ним.

Перспективными в этом плане могут оказаться выявленные в природе антимикробные пептиды (АМП), синтезирующиеся в ответ на контакт с чужеродными микроорганизмами или их внедрение [5–8]. АМП – это в основном амфифильные катионные пептиды, которые воздействуют на отрицательно заряженную мембрану микробных клеток. В результате такого воздействия развитие устойчивости патогенов к АМП в значительной степени затруднено, поскольку требует внесения серьезных изменений в структуру и электрофизиологические свойства их клеточной мембраны [5, 8–11]. Большинство известных природных АМП обладают не только высокой антимикробной активностью, но и повышенной гемолитической токсичностью. Причина такой токсичности пептидов – их относительно высокая гидрофобность, обусловленная повышенным содержанием (> 30%, а в ряде случаев и до 50%) гидрофобных аминокислотных остатков в общей аминокислотной цепи природного пептида [12, 13]. В связи с этим продолжают поиски новых эффективных АМП, обладающих высокой антимикробной активностью и низкой гемолитической токсичностью. Перспективными в этом плане могут оказаться синтетические антимикробные пептиды (САМП), сконструированные и синтезированные *de novo*, не опирающиеся на структуру природных АМП, т.е. сконструированные независимо от структуры многочисленных известных природных АМП [13–21].

Ранее с использованием такого подхода нами были сконструированы САМП, с классическим

широко известным и хорошо исследованным в литературе “*круговым*” (спиральным или кольцевым) типом амфипатичности (КТА) [22–24] (рис. 1а) и пептиды с малоизвестным “*линейным*” типом амфипатичности (ЛТА) [25, 26]. Было выявлено, что САМП с малоизвестным “линейным” типом амфипатичности (ЛТА) (**R9F2**, **K9F2** и **H9F2**) по сравнению с аналогичными САМП с часто встречающимся в природе классическим “круговым” типом амфипатичности (КТА) (**R5F5** (RFRRFFRRFF), **K5F5** (KFKKFFKKFF) и **H5F5** (HFHHFFHHFF)) проявляют не только пониженную гемолитическую токсичность, но и, в то же время, повышенную антигрибковую активность [26].

Пониженная гемолитическая активность САМП-ЛТА **R9F2**, **K9F2** и **H9F2** в силу их структурированности по сравнению с САМП-КТА **R5F5**, **K5F5** и **H5F5** (рис. 1а, 1б) обусловлена пониженным содержанием гидрофобных Phe-групп в составе пептида (18 и 50% соответственно) [26]. Гемолитическая активность при действии гистидин-содержащего САМП-ЛТА **H9F2** *in vitro* даже при достаточно высокой его концентрации в среде (500 мкМ), содержащей эритроциты, не превышала 4%, тогда как уровень гемолиза для пептида **H5F5** из группы САМП-КТА при той же его концентрации в среде 500 мкМ составляла уже > 60%, т.е. гистидин-содержащие САМП-КТА по уровню их действия на эритроциты оказались более чем в 15 раз токсичнее, чем аналогичные САМП-ЛТА [26].

Среди всех исследованных САМП-ЛТА гистидин-содержащий пептид **H9F2** показал не только низкий уровень гемолитической токсичности, но и максимально высокую антигрибковую активность [26]. В настоящей работе с целью оптимизации последовательности антигрибкового пептида **H9F2** с “линейным” типом амфипатичности и выявления более активных антигрибковых пептидов этого ряда необходимо было исследовать влияние на антигрибковую активность более длинных или, напротив, более коротких последовательностей таких гистидин-содержащих пептидов.

Ранее антимикробная активность пептидов, содержащих гидрофобные группы на N- или C-конце пептидной последовательности, не сравнивались. Поэтому необходимо было также выяснить, как влияет на антигрибковую активность

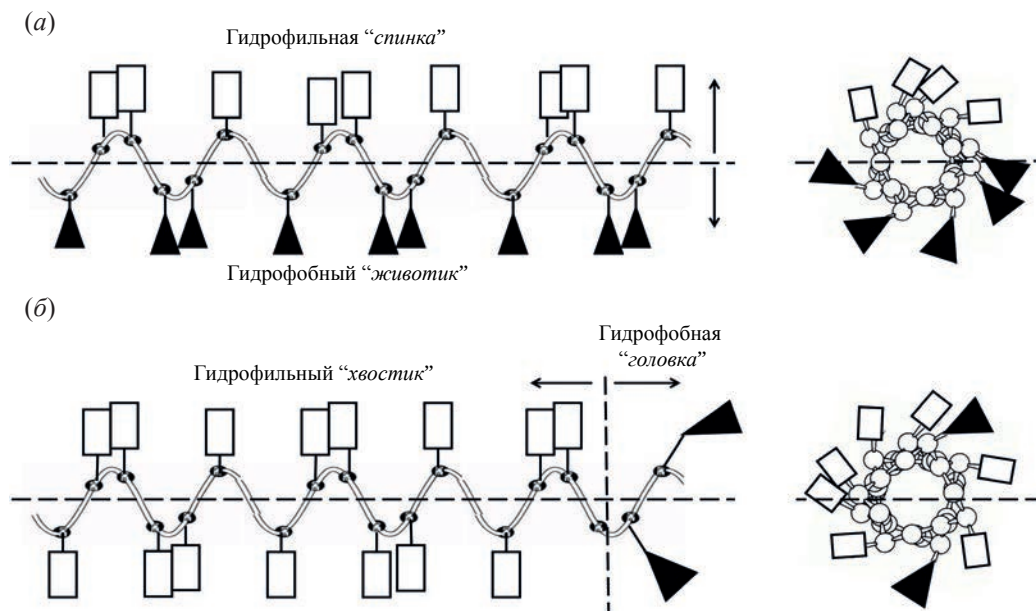


Рис. 1. Гипотетическое представление классического “кругового” (а) и “линейного” (б) типов амфипатичности α -спиральных пептидов. Прямоугольниками обозначены гидрофильные или катионные остатки аминокислот, треугольниками – гидрофобные остатки. В случае классического “кругового” типа амфипатичности (КТА) [6, 22, 23] гидрофобные и гидрофильные поверхности α -спиральной молекулы пептида разделены продольной осевой линией (а). На рисунке верхняя поверхность гидрофильная, нижняя – гидрофобная (амфипатичность по типу “спинка–животик”). В случае линейного типа амфипатичности (ЛТА) гидрофобные и гидрофильные (катионные) остатки аминокислот разнесены на противоположных концах вдоль линейной оси пептида. Гидрофобная и гидрофильная полярные области в этом случае разделены поперечной линией, перпендикулярной продольной оси пептида (б), где один (левый) конец молекулы имеет гидрофильный “хвостик”, а противоположный (правый) – гидрофобную “головку”. Справа представлены двумерные проекции “спиральных колес” Шиффер и Эдмундсона [20, 24] этих же пептидов. Видно, что полярная однородность гидрофобных и гидрофильных групп в случае “линейного” типа амфипатичности (б) в проекции, представленной слева, гораздо выше, чем когда та же молекула представлена в классическом виде в виде двумерных проекций “спиральных колес” (справа).

пептида гидрофобный остаток фенилаланина (Phe) при его расположении на N- или на C-конце гистидин-содержащих пептидов, какова роль гидрофобных остатков в таких пептидах, другими словами, какова, например, антигрибковая активность аналогичного гистидин-содержащего пептида, не имеющего в своем составе остатки Phe.

Необходимо было сравнить биологические свойства таких гистидин-содержащих САМП-ЛТА друг с другом, а также с описанными в литературе активными гистидин-богатыми пептидными антигрибковыми препаратами, например, с 12-звенным антигрибковым пептидом **P113** (AKRHHGYKRKFH) [27–29], который известен в качестве потенциального антигрибкового лекарственного препарата под названием **PAC-113** (2016-132), [28], являющегося одним из наиболее

коротких фрагментов природного антигрибкового белка гистатина 5 (Hst 5), обнаруженного в слюне человека [30–32]. На сегодняшний день пептид **P113** (**PAC-113**) продемонстрировал свою эффективность и безопасность у пациентов с кандидозом полости рта [28] и уже прошел фазу IIb клинических испытаний в качестве антигрибкового препарата (компания Pacgen Biopharmaceuticals Corporation, Канада) [32].

Цель настоящей работы – синтез и сравнительный скрининг антигрибковой активности ряда сконструированных нами *de novo* гистидин-содержащих САМП (**F2H7**, **F2H10**, **F2H13**, **F2H16**, **H10**, **H10F2**), обладающих так называемым “линейным” типом амфипатичности, исследование их гемолитических свойств и оценка терапевтического индекса, а также сравнение полученных результатов с аналогичными дан-

ными для гистидин-богатого 12-звенного антигрибкового пептида **P113** (AKRHNGYKRKFH) – потенциального лекарственного препарата, известного под названием **РАС-113**, одного из наиболее коротких и активных аналогов природного гистидин-богатого антигрибкового пептида Hst 5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структура, синтез и физико-химические свойства антимикробных пептидов. Для изучения влияния количества остатков гистидина, а также расположения гидрофобных групп в гистидин-содержащих пептидах на антигрибковую активность нами был сконструирован ряд модельных гистидин-содержащих САМП, образующих “линейный” тип амфипатичности (**F2H7**, **F2H10**, **F2H13**, **F2H16**, **H10F2**), а также пептиды **H10**, **P113** и **R9F2**, использованные в качестве контрольных последовательностей. Структура синтезированных пептидов включала в себя последовательность аминокислот, содержащую свободную *N*-концевую аминогруппу (придающую пептиду дополнительный положительный заряд), и амидную группу на *C*-конце цепи, нейтрализующую отрицательный заряд свободной концевой карбоксильной группы (табл. 1).

В амфифильных САМП-ЛТА **F2H7**, **F2H10**, **F2H13**, **F2H16** и **H10F2** гидрофобные Phe- и гидрофильные His-группы сгруппированы таким образом, что расположены раздельно на концах цепи пептида (табл. 1), создавая так называемый “линейный” тип амфипатичности [25, 26] (рис. 1б).

Среди исследованных пептидов были выделены четыре гистидин-содержащих пептида различной длины с различным содержанием аминокислотных остатков His: **F2H7**, **F2H10**, **F2H13** и **F2H16**, т.е. пептиды, содержащие 7, 10, 13 и 16 остатков His соответственно на *C*-конце пептида и по два остатка Phe на *N*-конце пептида, которые были использованы для выявления оптимального количества остатков гистидинов, необходимых для осуществления пептидами их антимикробной и гемолитической активности.

С целью определения влияния гидрофобных остатков в составе исследуемых гистидин-содержащих пептидов на антигрибковую активность использованы три пептида: пептид **H10F2** с десятью остатками His на *N*-конце и двумя гидрофобными остатками Phe на *C*-конце пептида; пептид **F2H10**, содержащий также десять остатков His и два остатка Phe на *N*-конце; декагистидин **H10** как контрольный пептид без гидрофобных остатков Phe. Аргинин-содержащий пептид **R9F2** по своей структуре принадлежит, так же как и остальные вышеперечисленные пептиды с остатками гистидина, к САМП-ЛТА (рис. 1б), но вместо гистидина содержит аргинин. Этот пептид был использован нами в качестве контрольного пептида для выяснения сравнительной роли влияния остатков His на антигрибковую активность. В качестве контрольного пептида был синтезирован также 12-звенный пептид **P113** [28, 32], являющийся одним из наиболее коротких и активных фрагментов Hst 5 [27–29], 26-мерного антигрибкового пептида Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr (**2001-5643**) [30], выделенного

Таблица 1. Структура пептидов

Пептид	Структура
F2H7	H-Phe-Phe-His-His-His-His-His-His-NH ₂
F2H10	H-Phe-Phe-His-His-His-His-His-His-His-His-NH ₂
F2H13	H-Phe-Phe-His-His-His-His-His-His-His-His-His-His-NH ₂
F2H16	H-Phe-Phe-His-His-His-His-His-His-His-His-His-His-His-His-NH ₂
H10	H-His-His-His-His-His-His-His-His-His-NH ₂
H10F2	H-His-His-His-His-His-His-His-His-His-Phe-Phe-NH ₂
P113	H-Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-NH ₂
R9F2	H-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Phe-Phe-NH ₂

из слюнной железы человека [30, 31] (в структуре Hst 5 подчеркнута последовательность фрагмента **P113**).

Синтез исследованных пептидов проводили стандартным твердофазным методом с использованием Fmoc-стратегии [33] согласно ранее опубликованной схеме [25] на пептидном синтезаторе PS3. Эффективность присоединения одного аминокислотного мономерного звена, определенная путем измерения количества удаляемых Fmoc-групп на каждой стадии конденсации, для синтезированных пептидов в среднем составила 97.2–99.8%. Конечные выходы пептидов после деблокирования, удаления с полимерного носителя и очистки методом офВЭЖХ составили ~50–67% (табл. 2). По данным офВЭЖХ и масс-спектрометрии, все выделенные пептиды соответствовали ожидаемой структуре и были гомогенными с содержанием основного вещества не менее 95%.

С увеличением количества остатков гистидина в составе пептидов **F2H7**, **F2H10**, **F2H13** и **F2H16** время их удерживания на колонке при офВЭЖХ закономерно повышалось от 18.2 до 20.0 мин (табл. 2). При этом пептид **H10**, не содержащий гидрофобных остатков Phe, в ряду всех исследованных пептидов имеет наименьшее время удерживания ($\tau = 12.8$ мин). Однако следует отметить неожиданную разницу во времени удерживания пептидов **F2H10** и **H10F2** одинакового состава, но содержащих остатки Phe на разных концах цепи – *N*- или *C*-конце ($\tau = 19.0$ и 22.5 мин соответственно) (табл. 2). По-видимому, наличие гидрофобных

остатков Phe на *N*- или *C*-конце пептида по-разному влияет на его пространственную структуру, увеличивая или уменьшая своего рода “замаскированность” или “размытость” гидрофобных групп в самом пептиде. Так, например, в случае пептида **F2H10** концевой остаток Phe на *N*-конце содержит гидрофильную положительно заряженную концевую аминокислотную группу, что в какой-то мере, вероятно, “разбавляет” или “размывает” гидрофобный кластер, образуемый двумя концевыми остатками Phe на *N*-конце такого пептида. Остатки Phe на *C*-конце цепи в случае пептида **H10F2**, в свою очередь, кооперативно группируясь друг с другом и с относительно нейтральной амидной группой, по-видимому, образуют более компактный гидрофобный кластер на *C*-конце, что, скорее всего, в целом влияет на гидрофобные свойства пептида **H10F2**, увеличивая его относительную гидрофобность относительно пептида **F2H10**.

По сравнению с 12-звенными гистидин-содержащими пептидами **F2H10** и **H10F2** с двумя остатками Phe на *N*- или *C*-концах цепи, время удерживания контрольного 12-мерного пептида **P113** оказалось наименьшим ($\tau = 19.0$, 22.5 и 16.6 мин соответственно) (табл. 2). Вероятно, такое различие в гидрофобности связано с наличием в пептиде **P113** дополнительно более гидрофильных остатков Arg и Lys и меньшим содержанием остатков His, а также наличием менее гидрофобного (по сравнению с Phe) остатком тирозина (Tyr).

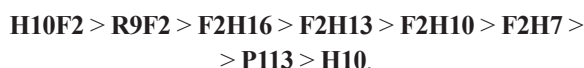
Таблица 2. Физико-химические характеристики пептидов

Пептиды	Общий выход синтеза*, %	Время удерживания (τ)**, мин, 30% CH ₃ CN	Молекулярная масса	
			расч. [M + H]	эксп. [M + H]
F2H7	66.7	18.2	1271.4	1271.7
F2H10	59.1	19.0	1682.8	1682.9
F2H13	55.2	19.6	2094.3	2094.1
F2H16	49.8	20.0	2505.7	2505.4
H10	63.4	12.8	1388.5	1388.8
H10F2	61.0	22.5	1682.8	1683.0
P113	56.5	16.6	1563.8	1564.1
R9F2	56.0	21.9	1717.0	1716.5

* Конечный выход после удаления с полимерного носителя и очистки методом офВЭЖХ в расчете на первую загруженную аминокислоту на полимерном носителе.

** В условиях аналитической офВЭЖХ (условия см. в “Эксперим. части”).

Гидрофобность всех исследованных пептидов по данным офВЭЖХ может быть расположена по возрастанию их времени удерживания в следующем ряду:



Видно, что наиболее гидрофобны в этом ряду пептиды **H10F2** и **R9F2**, а пептиды **P113** и **H10** обладают наименьшей гидрофобностью.

Таким образом, синтез всех пептидов в указанном режиме, как и ранее [25, 26], проходит достаточно эффективно, с относительно высокими выходами, которые закономерно снижаются с увеличением длины синтезируемой цепи. Зависимость гидрофобности соответствующих гистидин-содержащих пептидов с остатками Phe на N-конце цепи пептида, по данным офВЭЖХ, закономерно возрастает с увеличением количества остатков гистидина в их составе. Также следует отметить, что гидрофобность исследованных гистидин-содержащих пептидов зависит от расположения гидрофобных остатков Phe на C- или N-конце цепи пептида: пептид **H10F2** обладает большей гидрофобностью, чем аналогичный пептид **F2H10**.

Антигрибковая активность пептидов. Антигрибковую активность пептидов изучали на примере условно-патогенной дрожжеподобной грибковой культуры *C. albicans*. Каждый из пептидов в конечных концентрациях 0.3–100 мкМ добавляли к растущим культурам клеток *C. albicans* и наблюдали за ростом клеток. Влияние присутствия

пептидов в культуральной среде на рост самой культуры клеток контролировали измерением оптической плотности (оптического поглощения при 595 нм) суспензии растущих клеток во времени в течение 24 ч [25, 26, 34]. Для оценки антигрибковой активности исследованных пептидов были определены их минимальные подавляющие концентрации (МПК₅₀), при воздействии которых доля микробных частиц составляла 50% от концентрации частиц в контрольной культуре [25, 26]. Значения МПК₅₀, характеризующие антигрибковую активность исследованных пептидов, приведены в табл. 3. На рис. 2 значения МПК₅₀ исследованных пептидов для наглядности представлены в виде диаграммы обратных значений МПК₅₀ (1/МПК₅₀), отражающих прямую антигрибковую активность пептидов (чем выше значения 1/МПК₅₀, тем выше активность).

В качестве универсальных положительных контролей для сравнения относительной антигрибковой активности исследуемых пептидов использовали известные антисептические препараты – водные растворы хлоргексидина (ХГ) и нитрата серебра (AgNO₃). Во всех исследованных случаях (за исключением пептида **F2H7**) антигрибковая активность гистидин-содержащих пептидов существенно (в 3 и более раз) превышала активность контрольных препаратов AgNO₃ и ХГ (табл. 3, рис. 2).

Из данных табл. 3 и диаграммы обратных значений МПК₅₀ (рис. 2) видно, что антигрибковая активность пептидов **F2H7**, **F2H10**, **F2H13** и

Таблица 3. Значения МПК₅₀ исследованных пептидов по отношению к грибковым культурам клеток *C. albicans*

Пептиды	МПК ₅₀ *, мкМ
F2H7	8.9
F2H10	1.5
F2H13	1.5
F2H16	1.0
H10	0.7
H10F2	0.9
P113	3.4
R9F2	4.6
ХГ	6.8
AgNO ₃	9.9

* МПК₅₀ – минимальная подавляющая концентрация (концентрация пептида, при которой рост микроорганизмов подавляется на 50%). Среднестатистическая ошибка (или стандартное отклонение значений экспериментальных данных) не превышает 15–30%.

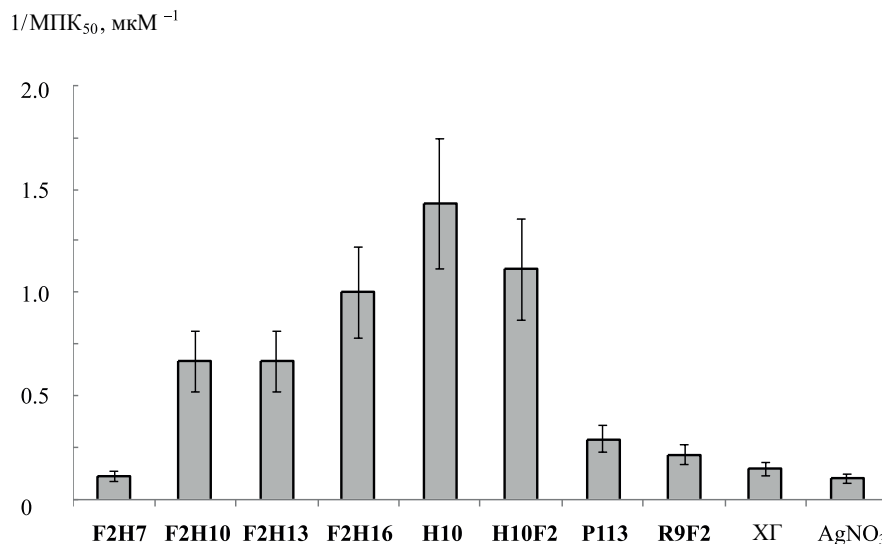


Рис. 2. Гистограмма обратных значений МПК₅₀ (1/МПК₅₀) пептидов по отношению к грибковым культурам клеток *C. albicans* после 24 ч инкубации с пептидами.

F2H16, содержащих Phe-группу на *N*-конце пептида, возрастает с увеличением числа остатков His (МПК₅₀ = 8.9, 1.5, 1.5 и 1.0 мкМ соответственно) (табл. 3). Так, например, значения МПК₅₀ пептидов в этом ряду возрастают, начиная со значения 8.9 мкМ для пептида **F2H7** и достигая максимума для пептида **F2H16** (МПК₅₀ = 1.0 мкМ) (табл. 3). Таким образом, антигрибковая активность исследованных пептидов возрастает с увеличением длины пептида и количества остатков His в их составе в следующем ряду:



Ранее антимикробную активность пептидов, содержащих гидрофобные группы на *N*- или *C*-конце пептида, не сравнивали. Поэтому неожиданным для нас оказалось то, что синтезированный нами пептид **H10F2**, содержащий Phe-группу на *C*-конце пептида, обладает не только более высокой гидрофобностью, но и более высокой антигрибковой активностью (МПК₅₀ = 0.9 мкМ) по сравнению с пептидом **F2H10**, содержащим Phe на *N*-конце цепи (МПК₅₀ = 1.5 мкМ) (табл. 3). Величина активности для пептида **H10F2** (МПК₅₀ = 0.9 мкМ) сопоставима с таковой для пептида **F2H16** (МПК₅₀ = 1 мкМ), проявляющего максимальную активность среди всех исследованных гистидин-содержащих пептидов с остатками Phe на *N*-конце. Таким образом, обнаружено, что

гистидин-содержащие пептиды с гидрофобной Phe-группой на *N*-конце пептида проявляют существенно меньшую антигрибковую активность, чем гистидин-содержащие пептиды, у которых гидрофобная Phe-группа находится на *N*-конце. Более того, оказалось, что декагистидиновый пептид **H10**, не содержащий остатков Phe, обладает еще большей антигрибковой активностью (МПК₅₀ = 0.7 мкМ) (табл. 3), чем аналогичные декагистидин-содержащие пептиды **F2H10** и **H10F2** с остатками Phe на *C*- или *N*-концах (МПК₅₀ = 1.5 и 0.9 мкМ соответственно) (табл. 3). Этот факт для нас оказался также неожиданным, поскольку, согласно литературным данным, механизм действия АМП, в том числе и гистидин-богатых пептидов, предполагает наличие у пептида амфифильности, которая необходима для взаимодействия АМП с клеточной мембраной микроорганизмов [14–16, 28]. Другими словами, для успешного проникновения через мембрану микробной клетки в составе пептида необходимо наличие не только катионных остатков аминокислот, но и гидрофобных остатков, способных взаимодействовать с гидрофобным слоем мембраны. Однако, исходя из полученных данных, видно, что остатки Phe на *C*- или *N*-концах гистидин-содержащих пептидов в нашем случае не только способствуют проявлению антигрибковой активности, а напротив, даже “мешают” или “пре-

пятствуют” проявлению такой активности, например, в случае пептида **F2H10** в большей, а в случае пептида **H10F2** – в меньшей степени. Таким образом, видно, что пептид **H10**, который не содержит никакие “препятствующие” проявлению антигрибковой активности гидрофобные остатки Phe, проявляет максимальную антигрибковую активность, превосходящую активность пептидов **F2H10** и **H10F2**, содержащих остатки Phe.

Аргинин-содержащий пептид **R9F2**, обладающий также “линейным” типом амфипатичности (рис. 1б), проявляет существенно (в 5 раз) меньшую антигрибковую активность ($\text{МПК}_{50} = 4.6 \text{ мкМ}$) (табл. 3), чем аналогичный гистидин-содержащий пептид **H10F2** ($\text{МПК}_{50} = 0.9 \text{ мкМ}$) (табл. 3), что свидетельствует о преимущественной значимости остатков His в структуре пептида для проявления его относительно высокой антигрибковой активности. Ранее нами было показано, что тот же аргинин-содержащий пептид **R9F2** гораздо эффективнее воздействует на бактериальные клетки, чем на клетки грибов, причем гораздо эффективнее, чем аналогичный гистидин-содержащий пептид **H9F2** [25, 26]. Вероятно, воздействие гистидин-содержащих пептидов на клетки грибов происходит по другому механизму [35, 36], чем при воздействии на бактериальные клетки [14–16].

Согласно литературным данным [28, 32, 35, 36], один из представителей гистатинов (гистидин-богатых пептидов) – Hst 5 – связывается с белками клеточной стенки *C. albicans* (Ssa1/2), с гликанами и поглощается клетками посредством переносчиков грибковых полиаминов. Попадая внутрь грибковых клеток, Hst 5 может влиять на функции митохондрий и вызывать окислительный стресс, однако конечная причина гибели клеток – дисрегуляция объема и дисбаланс ионов, вызванный осмотическим стрессом. Но поскольку специфической активностью по отношению к *C. albicans* обладает не только Hst 5, но и остальные гистатины, содержащие в своем составе остатки гистидинов, вполне уместно предположить, что на поверхности дрожжевых клеток *C. albicans* имеются специфические рецепторы к гистидин-богатым пептидам. Другими словами, причина проникновения гистидин-богатых пептидов (гистатинов), в том числе исследованных нами гистидин-содержащих САМП (**F2H7**, **F2H10**, **F2H13**,

F2H16, **H10F2**, **H10**), как можно предположить, – это не их катионные свойства, а наличие рецепторов, специфических к гистидин-богатым пептидам. Проникновение в клетку в данном случае, скорее всего, должно идти не по электростатическому, а по рецептор-опосредованному механизму, хотя, как утверждается в некоторых случаях, электростатические взаимодействия также играют немаловажную роль в первоначальном связывании с отрицательно заряженной поверхностью клеток *C. albicans* [28, 37].

Важность электростатических взаимодействий наряду с рецептор-опосредованными взаимодействиями подчеркивается в случае антигрибкового пептида **P113** (AKRHNGYKRKFH) (**2020-2654**), полученного из белка Hst 5 слюны человека [27], который сохраняет антигрибковую активность, сопоставимую с активностью исходной молекулы Hst 5. Утверждается, что механизм антигрибковой активности пептида **P113** аналогичен механизму Hst 5 [27]. Предполагается, что первоначально положительно заряженные остатки **P113** связываются с отрицательно заряженной поверхностью условно-патогенных дрожжевых клеток *C. albicans* посредством электростатических взаимодействий с последующим связыванием с белком клеточной стенки Ssa2 и транслокацией в цитоплазму [37]. При этом утверждается, что две катионные аминокислоты Lys2 и Lys10 в составе пептида **P113** играют важную роль в транспорте в цитозоль [37]. Однако антигрибковая активность исследованного нами пептида **H10** ($\text{МПК}_{50} = 0.7 \text{ мкМ}$) (табл. 3), содержащего лишь остатки His, оказалась намного (почти в 5 раз) выше, чем антигрибковая активность пептида **P113**. В случае пептида **P113** сам факт электростатического взаимодействия АМП с клеточной стенкой или мембраной дрожжевой клетки, скорее всего, важен, однако в случае пептида **H10** взаимодействие десяти остатков His с рецепторами клеточной стенки, вероятно, перекрывает по своей активности электростатические взаимодействия, которые дополнительно присутствуют в пептиде **P113** благодаря остаткам Arg и Lys. Три остатка His в составе пептида **P113**, вероятно, недостаточны для эффективного взаимодействия с гистидин-специфичными рецепторами, хотя электростатические взаимодействия, обусловленные катионными аминокислотными остатками Arg и Lys, в этом случае дополняют рецептор-

опосредованные взаимодействия. И, как видно на примере исследованных нами пептидов **F2H7**, **F2H10**, **F2H13** и **F2H16**, увеличение количества остатков гистидинов в пептидах действительно последовательно увеличивает их антигрибковую активность (табл. 3).

Таким образом, был проведен скрининг антигрибковой активности гистидин-содержащих пептидов с разной структурой. Антигрибковая активность (АГА) исследованных пептидов может быть расположена в следующем ряду по возрастанию их активности:



где АГА пептидов **P113** и **R9F2** самая низкая.

Результаты проведенного скрининга показывают, что антигрибковая активность исследованных пептидов зависит не только от содержания остатков гистидина в составе пептида, повышаясь с увеличением числа гистидинов в пептиде, но и от расположения гидрофобных остатков Phe. Гистидин-содержащие пептиды с гидрофобными остатками Phe на С-конце способны проявлять большую антигрибковую активность, чем аналогичные пептиды с остатками Phe на N-конце. Среди всех исследованных пептидов наибольшей антигрибковой активностью обладает пептид **H10**, не содержащий гидрофобных остатков Phe, который по своей антигрибковой активности эффективнее аналогичных гистидин-содержащих пептидов **F2H10** и **H10F2** с остатками Phe на N-или С-конце, а также пептида **F2H16**, содержащего максимальное количество остатков His, и который почти в 5 раз эффективнее известного в литературе антигрибкового пептида **P113** – одного из самых коротких активных фрагментов природного гистидин-богатого антигрибкового белка Hst 5.

Гемолитическая активность пептидов. При создании САМП в качестве потенциальных лекарственных препаратов одним из важных факторов, помимо высокой эффективности синтеза и повышенной антимикробной активности, является их относительно низкая токсичность по отношению к высшим организмам, в частности низкая гемолитическая активность создаваемых САМП. Ранее нами было показано, что САМП ЛТА по сравнению с САМП КТА обладают не только повышенной антигрибковой активностью, но и намного меньшей гемолитической актив-

ностью, поскольку в силу своего структурного строения таких пептидов (рис. 1а, 1б) содержание гидрофобных остатков у САМП ЛТА намного меньше, чем у САМП КТА [26]. Эксперименты, проведенные с лизисом эритроцитов, показали, что исследованные нами гистидин-содержащие САМП ЛТА (табл. 1 и 4) при их относительно высокой (400 мкМ) концентрации в среде, содержащей эритроциты, в большинстве случаев демонстрируют довольно низкую (не превышающую 10%) гемолитическую активность, за исключением пептида **F2H16**, для которого уровень лизиса эритроцитов составил 18.1% (табл. 4).

Гемолитическая активность увеличивающихся по длине САМП ЛТА **F2H7**, **F2H10**, **F2H13**, **F2H16** составляет 1.2, 4.2, 6.1 и 18.1% соответственно (табл. 4), а значения MPK_{50} для этих же пептидов – 8.9, 1.5, 1.5 и 1.0 мкМ соответственно (табл. 3). Другими словами, в данном случае видно, что увеличение антигрибковой активности пептидов в представленном ряду сопровождается одновременно увеличением их гемолитической активности и достигает максимального значения гемолитической токсичности 18.1% у пептида **F2H16**, который в этом же ряду обладает максимальной антигрибковой активностью ($MPK_{50} = 1.0$ мкМ) (табл. 3). Такая закономерность увеличения гемолитической и антигрибковой активности, скорее всего, связана с увеличением гидрофобности представленных пептидов

Таблица 4. Гемолитическая активность исследуемых пептидов

Пептиды	Гемолиз*, %
F2H7	1.2
F2H10	4.2
F2H13	6.1
F2H16	18.1
H10	0.4
H10F2	8.7
P113	0.1
R9F2	6.8

* Гемолиз проводили при концентрации пептидов 400 мкМ в среде эритроцитов.

($\tau = 18.2, 19.0, 19.6, 20.0$ мин соответственно) (табл. 2). Аналогичное влияние гидрофобности АМП на их антимикробную и гемолитическую активность ранее также было отмечено в литературе [14, 15, 38, 39].

Таким образом, гемолитическая активность (ГА) для увеличивающихся по длине пептидов **F2H7**, **F2H10**, **F2H13** и **F2H16**, как и в случае их антигрибковой активности, увеличивается в ряду:



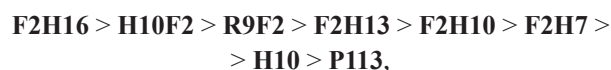
Такая же закономерность увеличения гемолитической и антигрибковой активности с увеличением гидрофобности исследуемых пептидов наблюдается и для пептидов **F2H10** и **H10F2** одинакового состава, но с разным расположением Phe-групп на концах цепи. Наиболее гидрофобный пептид **H10F2** по сравнению с пептидом **F2H10** ($\tau = 22.5$ и 19.0 мин соответственно) (табл. 2) показывает как наибольшую антигрибковую ($\text{МПК}_{50} = 0.9$ и 1.5 мкМ) (табл. 3), так и наибольшую гемолитическую активность (8.7 и 4.2%) (табл. 4).

Однако в некоторых случаях можно наблюдать и обратную зависимость между антибактериальной и гемолитической активностями. Так, например, видно, что наиболее активный антигрибковый пептид **H10** ($\text{МПК}_{50} = 0.7$ мкМ) (табл. 3) в то же время обладает и наименьшей (практически нулевой) гемолитической активностью, равной 0.4% , сравнимой с общим фоном гемолиза самих эритроцитов в среде без каких-либо реагентов (табл. 4). Такая низкая гемолитическая активность пептида **H10** по сравнению с другими пептидами, вероятно, связана с отсутствием в его составе гидрофобных остатков Phe и в связи с этим с довольно низкой гидрофобностью этого пептида ($\tau = 12.8$ мин) (табл. 2). Таким образом, гистидин-содержащий пептид **H10**, несмотря на свою относительно низкую гидрофобность, помимо своей повышенной антимикробной активности показал также и относительно низкую гемолитическую токсичность по отношению к эритроцитам.

Контрольный пептид **P113**, так же как и пептид **H10**, обладает наименьшей (практически нулевой) гемолитической активностью, равной 0.1% (табл. 4), сравнимой с общим фоном гемолиза самих эритроцитов, что также, вероятно, связано с низкой гидрофобностью этого пептида ($\tau = 16.6$ мин) (табл. 2). Однако антигрибковая активность пеп-

тида **P113** существенно ниже, чем у пептида **H10** ($\text{МПК}_{50} = 3.4$ и 0.7 мкМ соответственно) (табл. 3).

Гемолитическая активность (ГА) всех исследованных пептидов может быть представлена по возрастанию их активности в следующем ряду:



т.е. пептиды **H10** и **P113** по своей ГА в представленном ряду стоят на последнем месте и наименее токсичны по отношению к лизису эритроцитов.

Таким образом, повышенная или пониженная гемолитическая активность исследованных гистидин-содержащих пептидов не всегда коррелирует с их пониженной или повышенной антигрибковой активностью. Увеличение длины пептида приводит не только к увеличению их гидрофобности и антигрибковой активности, но также и к увеличению их гемолитической токсичности. Напротив, среди всех исследованных пептидов гистидин-содержащий пептид **H10** показал не только самую высокую антигрибковую, но и наименьшую гемолитическую активность. Описанный в литературе гистидин-богатый пептид **P113** также обладает минимальной гемолитической активностью, однако его антигрибковая активность почти в 5 раз ниже, чем у пептида **H10**. Пептиды **F2H16** и **H10F2** хотя и демонстрируют сравнительно высокую антигрибковую активность, сопоставимую с активностью пептида **H10**, но уровень их гемолитической токсичности (особенно для пептида **F2H16**) остается относительно высоким.

Терапевтический индекс. Увеличение антимикробной активности АМП часто сопровождается увеличением их гемолитического действия, т.е. способности разрушать эритроциты [14, 15, 40, 41]. Активный в отношении микроорганизмов препарат может оказаться, в свою очередь, также и довольно токсичным. В таком случае терапевтический потенциал антимикробных агентов оценивается на основе селективности их действия на исследуемые патогенные микроорганизмы по сравнению с аналогичным их действием на эритроциты в виде терапевтического индекса (ТИ), т.е. как отношение величины минимальной гемолитической концентрации (МГК) к величине МПК, где МГК – концентрация пептида, вызывающая лизис определенной доли свежих красных кровяных телец [26, 42].

Для оценки селективности действия пептидов нами были определены величины МГК пептидов и вычислены значения их ТИ (табл. 5). За величину МГК в нашем случае мы принимали концентрацию пептида, которая вызывала лизис 4% свежих красных кровяных клеток. Поскольку уровень гемолитической активности пептида **H10** даже при максимальной его концентрации (400 мкМ) в среде приближается к нулю, а дальнейшее увеличение его концентрации приводит к снижению растворимости пептида, то подсчитать точное значение МГК, определяемую как концентрация пептида, которая вызывает лизис 4% свежих красных кровяных клеток, для данного пептида путем повышения его концентрации в среде не удастся. В этом случае значение МГК для пептида **H10** оценивали как величину > 1000 мкМ, а ТИ принимали как величину > 1400 ($1000/0.7 = \sim 1400$) (табл. 5). Аналогичный расчет использовали и при оценке селективности воздействия для пептида **P113**, который также при максимально высокой концентрации пептида 400 мкМ в среде, содержащей эритроциты, проявляет довольно низкую (практически нулевую) гемолитическую активность, равную 0.1% (табл. 4). Величину МГК для этого пептида также принимали > 1000 мкМ,

Таблица 5. Минимальная гемолитическая концентрация (МГК) и терапевтический индекс (ТИ) исследуемых пептидов

Пептиды	МГК*, мкМ	ТИ**
F2H7	700	79
F2H10	350	233
F2H13	370	247
F2H16	60	60
H10	$>> 1000$	> 1400
H10F2	200	222
P113	$>> 1000$	> 300
R9F2	300	65

* МГК – минимальная гемолитическая концентрация – такая концентрация пептида (мкМ), которая вызывает лизис 4% свежих красных кровяных клеток. Средняя ошибка приведенных значений МГК, ТИ и СГ не превышает величину 15–20%.

** ТИ – терапевтический индекс для каждой культуры микроорганизмов по отдельности, выраженный в виде отношения значения МГК к МПК₅₀. Большие значения ТИ указывают на большую селективность пептида.

а величину ТИ, соответственно, принимали > 300 ($1000/3.4 = \sim 300$) (табл. 5).

В случае увеличивающихся по длине пептидов **F2H7**, **F2H10**, **F2H13** и **F2H16** наблюдается повышение их антигрибковой активности и одновременное увеличение их гемолитической активности, рассчитанной как МГК (МПК₅₀ = 8.9, 1.5, 1.5 и 1.0 мкМ) (табл. 3 (МГК = 700, 350, 370 и 60 мкМ соответственно) (табл. 5). Первый из этих факторов увеличивает, а последний – снижает селективность этих препаратов. В результате селективность пептида **F2H7** (ТИ = 79) (табл. 5) с наименьшей антигрибковой активностью (МПК₅₀ = 8.9 мкМ) (табл. 3) становится сопоставимой с селективностью пептида **F2H16** (ТИ = 60) (табл. 5), обладающего максимальной в представленном ряду антигрибковой активностью (МПК₅₀ = 1.0 мкМ) (табл. 3). В то же время селективность промежуточных по своей антигрибковой активности пептидов **F2H10** и **F2H13** (МПК₅₀ = 1.5 и 1.5 мкМ) (табл. 3) становится существенно выше (ТИ = 233 и 247) (табл. 5), чем селективность для крайних по активности в этом же ряду пептидов **F2H7** и **F2H16** (ТИ = 79 и 60) (табл. 5). Другими словами, дальнейшее увеличение длины гистидин-содержащих пептидов (более чем на 16 остатков гистидина) с целью повышения их антигрибковой активности в данном случае, вероятно, нецелесообразно, поскольку гемолитическая токсичность пептидов в представленном ряду увеличивается быстрее, чем их антигрибковая активность, и, как результат, селективность таких пептидов начинает снижаться. Таким образом, в плане терапевтической значимости в представленном ряду пептидов оптимальны пептиды **F2H10** или **F2H13**, обладающие более высокой селективностью, чем более короткие или более протяженные пептиды **F2H7** или **F2H16**.

При сравнении антигрибковых и гемолитических свойства двух одинаковых по составу пептидов **F2H10** и **H10F2**, но с разным расположением гидрофобных Phe-групп на концах, видно, что более эффективен по отношению к *C. albicans* пептид **H10F2** (МПК₅₀ = 0.9 мкМ) (табл. 3), но в то же время и более токсичен по отношению к эритроцитам (МГК = 200 мкМ) (табл. 5), а менее эффективный пептид **F2H10** (МПК₅₀ = 1.5 мкМ) (табл. 3), напротив, менее токсичен (МГК = 350 мкМ) (табл. 4). В итоге селективности

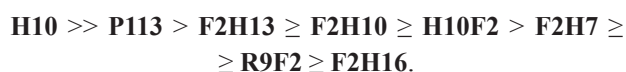
обоих пептидов сопоставимы (ТИ = 222 и 233 соответственно) (табл. 5). Тем не менее пептид **H10F2** по своей терапевтической значимости более предпочтителен, поскольку обладает большей антигрибковой активностью и для достижения соответствующего биологического эффекта требует использования меньшей концентрации в среде.

При сравнении антигрибковых и гемолитических свойств гистидин-содержащих САМП ЛТА с аналогичными по структуре пептидами, содержащими другие катионные аминокислотные остатки (например, аргинин), можно отметить, что аргинин-содержащий САМП ЛТА **R9F2** проявляет более низкую гемолитическую активность (МГК = 300 мкМ) (табл. 5) по сравнению с близким по структуре гистидин-содержащим САМП ЛТА **H10F2** (МГК = 200 мкМ) (табл. 5). Тем не менее селективность пептида **R9F2** (ТИ = 65) (табл. 5) более чем в 3 раза ниже селективности пептида **H10F2** (ТИ = 222) (табл. 5) вследствие более чем в 5 раз меньшей антигрибковой активности аргинин-содержащего пептида **R9F2** по сравнению с пептидом **H10F2** (МПК₅₀ = 4.6 и 0.9 мкМ соответственно) (табл. 3). Таким образом, гистидин-содержащий САМП ЛТА не только более активен по отношению к грибковой культуре, но и обладает большей селективностью воздействия по сравнению с аргинин-содержащим пептидом аналогичной структуры.

С точки зрения селективности воздействия особо следует обратить внимание на пептид **H10**, для которого наблюдается как наибольшая антигрибковая активность (МПК₅₀ = 0.7 мкМ) (табл. 3), так и минимальная гемолитическая токсичность (МГК > 1000 мкМ) (табл. 5). В результате селективность такого пептида среди всех исследованных пептидов максимально высокая (ТИ > 1400) (табл. 5). Пептид **P113** также обладает минимальной гемолитической токсичностью (МГК > 1000 мкМ) (табл. 5). Тем не менее антигрибковая активность пептида **P113** (МПК₅₀ = 3.4 мкМ) (табл. 3) почти в 5 раз ниже, чем активность пептида **H10**. Таким образом, хотя контрольный пептид **P113** обладает низкой гемолитической токсичностью, сопоставимой с таковой для пептида **H10**, и относительно высокой селективностью (ТИ > 300) (табл. 5), тем не менее пептид **H10** характеризуется более чем в

4 раза превосходящей селективностью воздействия (ТИ > 1400) (табл. 5).

В отношении селективности, выраженной величиной ТИ, исследованные пептиды по возрастанию значений их ТИ могут быть представлены в следующем ряду:



Исходя из такого сравнения, видно, что на первом месте по селективности воздействия стоят пептиды **H10** и **P113**, затем пептиды **F2H13**, **F2H10** и **H10F2**, на последнем месте – пептид **F2H16**.

Таким образом, скрининг антигрибковой и гемолитической активности гистидин-содержащих САМП показал, что среди всех исследованных пептидов пептид **H10** обладает не только наибольшей антимикробной и наименьшей гемолитической активностью, но и наибольшей селективностью (ТИ > 1400), превосходящую более чем в 4 раза селективность известного из литературы гистидин-богатого антигрибкового пептида **P113**. Пептид **H10** может быть представлен как один из перспективных антигрибковых пептидных препаратов не только в плане его высокой антигрибковой активности, низкой гемолитической токсичности и, соответственно, его высокой терапевтической значимости, но и в плане экономичности его синтеза по сравнению с другими представленными пептидами, в том числе пептидом **P113**, поскольку аминокислотная последовательность пептида **H10** гомогенна и состоит лишь из одних аминокислотных остатков гистидина. Пептиды **F2H13**, **F2H10** и **H10F2** обладают сопоставимой друг с другом высокой селективностью (ТИ = 247, 233 и 222 соответственно) (табл. 5) и также могут использоваться для дальнейших исследований в качестве потенциальных антигрибковых пептидных препаратов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использовали реактивы для пептидного синтеза (Sigma, Fisher Scientific, Bachem, Protein Technologies, США); полистирольный полимер 855013 Novabiochem® NovaSyn®TG Sieber resin, функционализированный 9-Fmoc-аминоксантен-3-илоксильным

фрагментом, 200 ммоль/г (Merck Schuchardt OHG, Германия); защищенные аминокислотные мономеры (Protein Technologies, США); конденсирующий реагент HATU – 2-(1*H*-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионгексафторфосфат (кат. № 023926, Oakwood Products Inc., США).

Синтез антимикробных пептидов. Пептиды были синтезированы твердофазным методом с использованием Fmoc-стратегии [33] аналогично опубликованной ранее схеме [25] на пептидном синтезаторе PS3 (Protein Technologies, США). Содержание основного вещества в синтезированных пептидах по данным офВЭЖХ составляло не менее 95%.

Штамм условно-патогенного гриба *Candida albicans* ЭМТК 34 поддерживали и нарабатывали в Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Образец крови для получения эритроцитов был предоставлен медицинской лабораторией Гемотест (г. Новосибирск).

Аналитическую офВЭЖХ проводили на хроматографе LC-20 AD (Shimadzu, Япония) с использованием детектора SPD-M20A (Shimadzu, Япония) на колонке Gemini 5 мкм NX-C18, 110 Å, 4.6 × 250 мм (Phenomenex Inc., США), уравновешенной 0.1%-ным раствором TFA, в линейном градиенте концентрации ацетонитрила 0–30% в течение 30 мин при скорости потока 1 мл/мин, УФ-детекция при длине волны 210, 220, 240 и 260 нм.

Молекулярные массы пептидов (табл. 2) определяли с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF (REFLEX III, Bruker Daltonics, Германия) и ESI-MS (LC/MS XCT Ultra, Agilent Technologies, США) в Центре масс-спектрометрического анализа Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Антимикробная активность пептидов. Растворы пептидов определенной концентрации для оценки антимикробной активности готовили из сухих навесок. Для пептидов **F2H7**, **F2H10**, **F2H13**, **F2H16**, **H10F2** и **R9F2**, которые содержали по два остатка Phe, дополнительно проводили определение концентрации путем измерения поглощения в ближней УФ-области

спектра с использованием значения молярного коэффициента поглощения при длине волны 260 нм, равного 330 л моль^{–1} см^{–1}, который ранее был определен, исходя из соответствующих растворов пептидов, приготовленных из сухих навесок. Исходные растворы пептидов с концентрацией 1–2 мМ хранили при –15°C в темноте не более месяца. Непосредственно перед экспериментом растворы разбавляли до нужной концентрации средой Сабуро. Исходная концентрация пептидов для приготовления проб для дальнейшего испытания их гемолитической активности составляла 2–4 мМ в воде.

Для работы использовали взвесь ночных бульонных культур, выращенных на стандартных питательных средах. Количество микроорганизмов (титр) во взвеси определяли по оптической плотности при длине волны 595 нм.

Для оценки антигрибкового действия пептидов проводили совместное инкубирование клеточных культур с исследуемыми пептидными препаратами в 96-луночных планшетах для культивирования. Ночные бульонные культуры *C. albicans* ресуспендировали в среде Сабуро, доводя количество микроорганизмов до посевной дозы ~5 × 10⁵ КОЕ/мл. В лунки последовательно вносили раствор исследуемых препаратов, а затем клеточную суспензию в соотношении 1 : 9 по объему (общий объем 200 мкл) в конечных концентрациях 0.3–50 мкМ. В качестве отрицательного контроля вместо тестируемого пептида вносили аналогичный объем среды Сабуро. В качестве положительного контроля вместо тестируемого пептида вносили аналогичный объем водных растворов ХГ или AgNO₃ в соответствующих разведениях, так же как и для пептидов, в конечных концентрациях 0.3–50 мкМ. Инкубацию проводили в течение 24 ч при 37°C и 560 об/мин на шейкер-инкубаторе (Kuhner LT-X, АБТЕК, Россия). В нулевой точке и через 2, 4, 5, 6, 7, 8 и 24 ч после начала инкубации измеряли оптическую плотность суспензии на планшетном спектрофотометре iMark™ (Bio-Rad, США) при длине волны 595 нм. Результаты выражали в виде среднего значения оптической плотности клеточной суспензии в трех независимых экспериментах, выполненных в двух повторях. Среднестатистическая ошибка (или стандартное отклонение значений экспериментальных данных)

при этом не превышала 15–30%. Стандартное отклонение (S) рассчитывали по формуле:

$$S = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - x_m)^2}$$

где n – число измерений, x_i – i -тый элемент выборки, x_m – среднее арифметическое значение выборки.

Расчет МПК₅₀. Исходя из полученных средних значений оптической плотности суспензий клеточных культур, определяли величины относительной степени роста культуры микробных клеток (N_p/N_0) в виде отношения оптической плотности микробных частиц после добавления пептидного препарата (N_p) к оптической плотности в контрольной культуре (N_0). Концентрацию пептида, при которой величина относительной степени роста культуры микробных клеток составляла 50%, определяли по кривым зависимости величины относительной степени роста культуры микробных клеток (N_p/N_0) в процентах от концентрации пептидов [25, 43].

Фотометрический метод оценки гемолитической активности антимикробных пептидов в отношении эритроцитов человека. Гемолитическую активность исследуемых пептидов тестировали в отношении свежих эритроцитов человека согласно ранее опубликованным методикам [25, 42, 44]. Метод основан на измерении оптической плотности при длине волны 540 нм в надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования суспензии эритроцитов, поскольку при разрушении эритроцитов вышедший из клеток гемоглобин придает среде характерную красную окраску, сохраняющуюся после осаждения эритроцитов. Свежие эритроциты человека трижды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS: 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM K₂HPO₄, pH 7.4), содержащим 173 mM NaCl и 2.7 mM KCl. К 80 мкл суспензии эритроцитов в PBS добавляли растворы пептидов в виде двукратных серийных разведений до конечного объема 100 мкл и концентрации суспензии эритроцитов 4% (по объему, за 100% принимали объем суспензии осажденных центрифугированием эритроцитов), инкубировали в течение 30 мин при 37°C. После центрифугирования и отделения осадка измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 540 нм. За 100% гемолиза принимали оптическую плотность раствора,

полученную при действии на эритроциты 10%-ного раствора тритона X-100. За 0% принимали оптическую плотность, полученную при действии на эритроциты “холостого” буферного раствора, не содержащего пептидных проб. Гемолитический анализ проводили дважды с использованием одного образца крови человека. Данные представлены как среднее значение ± стандартные отклонения трех независимых экспериментов. Средняя ошибка эксперимента при этом не превышала 15–20%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами были сконструирован и синтезирован ряд новых гистидин-содержащих САМП ЛТА **F2H7**, **F2H10**, **F2H13**, **F2H16** и **H10F2** с “линейным” типом амфипатичности, а также неамфифильный по своей структуре пептид **H10**, не имеющий гидрофобных остатков и содержащий исключительно относительно гидрофильные остатки гистидина. Исследована антигрибковая и гемолитическая активность синтезированных пептидов. Проведено сравнение полученных результатов с аналогичными данными для известного из литературы гистидин-богатого 12-звенного антигрибкового пептида **P113** (AKRHHGYKRKFH) (**2020-2654**) – потенциального лекарственного препарата под названием **PAC-113**, одного из наиболее коротких и активных аналогов природного антигрибкового пептида Hst 5.

Показано, что представленные гистидин-содержащие САМП ЛТА способны эффективно подавлять рост условно-патогенных грибов *Candida albicans* и обладают низкой гемолитической активностью, в большинстве случаев не превышающей 10% даже при их относительно высокой (400 мкМ) концентрации в среде, содержащей эритроциты.

Антигрибковая активность исследованных пептидов возрастает с увеличением количества остатков гистидина в их составе, достигая максимального значения для гистидин-содержащего пептида **F2H16** (МПК₅₀ = 1.0 мкМ).

Показано, что с увеличением длины цепи пептидов растет также их гемолитическая токсичность. В отношении терапевтической значимости оптимальными в представленном ряду гистидин-содержащих САМП ЛТА оказались пептиды **F2H10** и **F2H13**, обладающие более

высокой селективностью, чем короткий или более протяженный пептиды **F2H7** или **F2H16**. Терапевтический индекс (ТИ) для этих пептидов составил 233, 247, 79 и 60 соответственно.

Гистидин-содержащие производные пептидов с гидрофобными остатками Phe на *N*-конце пептида (**F2H10**) по сравнению с аналогичными пептидами одинакового состава, но содержащими остатки Phe на *C*-конце (**H10F2**), обладают меньшей гидрофобностью, проявляют меньшую антигрибковую активность и меньшую гемолитическую токсичность.

Показано, что декагистидиновый пептид, не содержащий остатков Phe (**H10**), обладает еще большей антигрибковой активностью ($\text{МПК}_{50} = 0.7$ мкМ), чем аналогичные пептиды **F2H10** и **H10F2** с остатками Phe на *C*- или *N*-концах ($\text{МПК}_{50} = 1.5$ и 0.9 мкМ соответственно). Этот факт для нас оказался неожиданным, поскольку, согласно литературным данным, механизм действия АМП, в том числе и гистидин-богатых пептидов, предполагает наличие у пептида амфифильности, которая необходима для взаимодействия АМП с клеточной мембраной микроорганизмов [14–16, 28].

Вероятно, в данном случае взаимодействие гистидин-содержащих САМП с клеточной мембраной и клеточными стенками грибов мало связано с амфипатичностью пептидов, а преимущественно обусловлено рецептор-опосредованными взаимодействиями, связанными с наличием на поверхности клеток грибов рецепторов, специфических к гистидин-богатым пептидам, таких как, например, белки клеточной стенки *C. albicans* (Ssa1/2) [28, 32, 35, 36].

Пептид **H10** по своей антигрибковой активности оказался эффективнее не только всех остальных гистидин-содержащих пептидов, в том числе и пептида **F2H16** с 16 остатками гистидина, но и в 4–5 раз эффективнее антигрибкового пептида **P113** (AKRHNGYKRKFH) (2020-2654) ($\text{МПК}_{50} = 3.4$ мкМ) – короткого активного фрагмента природного Hst 5, хорошо известного из литературы.

Вероятно, три остатка His в составе пептида **P113** недостаточны для эффективного взаимодействия с рецепторами, и электростатические взаимодействия с катионными аминокислотными остатками Arg и Lys в этом случае лишь дополняют

рецептор-опосредованные взаимодействия, но не позволяют при этом достичь той антигрибковой активности, как у пептида **H10**, содержащего все десять остатков His.

На примере исследованных пептидов **F2H7**, **F2H10**, **F2H13** и **F2H16** было показано, что увеличение количества остатков His в пептидах действительно последовательно увеличивает их антигрибковую активность.

Показано, что, благодаря своей относительно низкой гемолитической и высокой антигрибковой активности, представленные гистидин-содержащие САМП ЛТА **F2H10**, **F2H13**, **F2H16**, **H10F2** обладают относительно высокими значениями ТИ (ТИ > 60).

Среди всех исследованных пептидов **H10** и **P113** обладают минимальными (практически нулевыми) значениями гемолитической активности.

Вследствие своей более высокой антигрибковой активности селективность пептида **H10** (ТИ > 1400) превышает селективность пептида **P113** (ТИ > 340) более чем в 4 раза.

Таким образом, скрининг антигрибковой и гемолитической активности гистидин-содержащих САМП показал, что среди всех исследованных пептидов **H10** обладает не только наибольшей антимикробной и наименьшей гемолитической активностью, но и наибольшей селективностью (ТИ > 1400), превосходящей более чем в 4 раза селективность известного из литературы гистидин-богатого антигрибкового пептида **P113**.

Пептид **H10** может быть представлен как один из перспективных антигрибковых пептидных препаратов не только благодаря его высокой антигрибковой активности, низкой гемолитической токсичности и, соответственно, высокой терапевтической значимости, но и вследствие экономичности его синтеза по сравнению с другими исследованными пептидами, в том числе пептидом **P113**, поскольку аминокислотная последовательность пептида **H10** гомогенна и состоит лишь из аминокислотных остатков гистидина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Штаммы микроорганизмов взяты из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование поддержано в рамках государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН № 121031300042-1.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S.M., Seifert H., Wenzel R.P., Edmond M.B. // Clin. Infect. Dis. 2004. V. 39. P. 309–317.
<https://doi.org/10.1086/421946>
2. Омельчук О.А., Тевяшова А.Н., Щекотихин А.Е. // Успехи химии. 2018. Т. 87. С. 1206–1225.
<https://doi.org/10.1070/RCR4841>
3. Perlín D.S. // Clin. Infect. Dis. 2015. V. 61. P. S612–S617.
<https://doi.org/10.1093/cid/civ791>
4. Whaley S.G., Berkow E.L., Rybak J.M., Nishimoto A.T., Barker K.S., Rogers P.D. // Front. Microbiol. 2017. V. 7. P. 2173.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02173>
5. Peschel A., Sahl H.G. // Nat. Rev. Microbiol. 2006. V. 4. P. 529–536.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1441>
6. Bahar A.A., Ren D. // Pharmaceuticals (Basel). 2013. V. 6. P. 1543–1575.
<https://doi.org/10.3390/ph6121543>
7. Chung P.Y., Khanum R.J. // Microbiol. Immunol. Infect. 2017. V. 50. P. 405–410.
<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005>
8. Kim H., Jang J.H., Kim S.C., Cho J.H. // J. Antimicrob. Chemother. 2014. V. 69. P. 121–132.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkt322>
9. Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2016. V. 42. P. 229–248.
<https://doi.org/10.1134/S1068162016030055>
10. Mookherjee N., Hancock R.E. // Cell. Mol. Life Sci. 2007. V. 64. P. 922–933.
<https://doi.org/10.1007/s00018-007-6475-6>
11. Navon-Venezia S., Feder R., Gaidukov L., Carmeli Y., Mor A. // Antimicrob. Agents Chemother. 2002. V. 46. P. 689–694.
<https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.689-694.2002>
12. Ajingi Ya.S., Jongruja N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 463–479.
<https://doi.org/10.1134/S1068162020040044>
13. Deslouches B., Hasek M.L., Craigo J.K., Steckbeck J.D., Montelaro R.C. // J. Med. Microbiol. 2016. V. 65. P. 554–565.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.000258>
14. Liu X., Cao R., Wang S., Jia J., Fei H. // J. Med. Chem. 2016. V. 59. P. 5238–5247.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b02016>
15. Hollmann A., Martínez M., Noguera M.E., Augusto M.T., Disalvo A., Santos N.C., Semorile L., Maffia P.C. // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2016. V. 141. P. 528–536.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.003>
16. Clark S., Jowitt T.A., Harris L.K., Knight C.G., Dobson C.B. // Commun. Biol. 2021. V. 4. P. 605.
<https://doi.org/10.1038/s42003-021-02137-7>
17. Dinh T.T.T., Kim D.-H., Lee B.-J., Kim Y.-W. // Bull. Korean Chem. Soc. 2014. V. 35. P. 3632–3636.
<https://doi.org/10.5012/BKCS.2014.35.12.3632>
18. Tew G.N., Liu D., Chen B., Doerksen R.J., Kaplan J., Carroll P.J., Klein M.L., de Grado W.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 5110–5114.
<https://doi.org/10.1073/pnas.082046199>
19. Javadpour M.M., Juban M.M., Lo W.C., Bishop S.M., Alberty J.B., Cowell S.M., Becker C.L., McLaughlin M.L. // J. Med. Chem. 1996. V. 39. P. 3107–3113.
<https://doi.org/10.1021/jm9509410>
20. Chen Y., Mant C.T., Farmer S.W., Hancock R.E., Vasil M.L., Hodges R.S. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 12316–12329.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m413406200>
21. Wiradharma N., Sng M., Khan M., Ong Z.Y., Yang Y.Y. // Macromol. Rapid Commun. 2013. V. 34. P. 74–80.
<https://doi.org/10.1002/marc.201200534>
22. Jiang Z., Vasil A.I., Hale J.D., Hancock R.E., Vasil M.L., Hodges R.S. // Biopolymers. 2008. V. 90. P. 369–383.
<https://doi.org/10.1002/bip.20911>
23. Huang Y.B., Huang J.F., Chen Y.X. // Protein Cell. 2010. V. 1. P. 143–152.
<https://doi.org/10.1007/s13238-010-0004-3>
24. Schiffer M., Edmundson A.B. // Biophys. J. 1967. V. 7. P. 121–135.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(67\)86579-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(67)86579-2)

25. Amirkhanov N.V., Bardasheva A.V., Tikunova N.V., Pyshnyi D.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 681–690.
<https://doi.org/10.1134/S106816202103002X>
26. Amirkhanov N.V., Bardasheva A.V., Tikunova N.V., Pyshnyi D.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 48. P. 937–948.
<https://doi.org/10.1134/S1068162022050041>
27. Rothstein D.M., Spacciapoli P., Tran L.T., Xu T., Roberts F.D., Serra M.D., Buxton D.K., Oppenheim F.G., Friden P. // Antimicrob. Agents Chemother. 2001. V. 45. P. 1367–1373.
<https://doi.org/10.1128/AAC.45.5.1367-1373.2001>
28. Cheng K.T., Wu C.L., Yip B.S., Chih Y.H., Peng K.L., Hsu S.Y., Yu H.Y., Cheng J.W. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 2654.
<https://doi.org/10.3390/ijms21072654>
29. Zolin G.V.S., Fonseca F.H.D., Zambom C.R., Garrido S.S. // Biomolecules. 2021. V. 11. P. 1209.
<https://doi.org/10.3390/biom11081209>
30. Helmerhorst E.J., Hof W.V., Breeuwer P., Troxler R.F., Amerongen A.V.N., Oppenheim F.G. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 5643–5649.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M008229200>
31. Oppenheim F.G., Xu T., McMillian F.M., Levitz S.M., Diamond R.D., Offner G.D., Troxler R.F. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 7472–7477.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3286634/>
32. Rautenbach M., Troskie A.M., Vosloo J.A. // Biochimie. 2016. V. 130. P. 132–145.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.05.013>
33. Chan W.C., White P.D. // Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach / Eds. Chan W.C., White P.D. Oxford: IRL Press, 2000. P. 64–66.
34. Amirkhanov N.V., Tikunova N.V., Pyshnyi D.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 833–841.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060037>
35. Konakbayeva D., Karlsson A.J. // Curr. Opin. Biotechnol. 2023. V. 81. P. 102926.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2023.102926>
36. Puri S., Edgerton M. // Eukaryot. Cell. 2014. V. 13. P. 958–964.
<https://doi.org/10.1128/ec.00095-14>
37. Jang W.S., Li X.S., Sun J.N., Edgerton M. // Antimicrob. Agents Chemother. 2008. V. 52. P. 497–504.
<https://doi.org/10.1128/aac.01199-07>
38. Cheng Q., Zeng P. // Curr. Pharm. Des. 2022. V. 28. P. 3527–3537.
<https://doi.org/10.2174/1381612828666220902124856>
39. Wieprecht T., Dathe M., Epand R.M., Beyermann M., Krause E., Maloy W.L., MacDonald D.L., Biehnert M. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 12869–12880.
<https://doi.org/10.1021/bi971398n>
40. Dathe M., Wieprecht T., Nikolenko H., Handel L., Maloy W.L., MacDonald D.L., Beyermann M., Biehnert M. // FEBS Lett. 1997. V. 403. P. 208–212.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00055-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00055-0)
41. Okorochenkov S.A., Zheltukhina G.A., Nebol'sin V.E. // Biochem. Moscow Suppl. Ser. B. 2011. V. 5. P. 95–102.
<https://doi.org/10.1134/S1990750811020120>
42. Panteleev P.V., Bolosov I.A., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. // J. Pept. Sci. 2015. V. 21. P. 105–113.
<https://doi.org/10.1002/psc.2732>
43. Amirkhanov N.V., Tikunova N.V., Pyshnyi D.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 492–503.
<https://doi.org/10.1134/S1068162018050035>
44. Jacobsen F., Mohammadi-Tabrizi A., Hirsch T., Mittler D., Mygind P.H., Sonksen C.P., Raventos D., Kristensen H.H., Gattermann S., Lehnhardt M., Daigeler A., Steinau H.U., Steinstraesser L. // J. Antimicrob. Chemother. 2007. V. 59. P. 493–498.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkl513>

Synthetic Antimicrobial Peptides.

V. Histidine-containing Antifungal Peptides with a “Linear” Type of Amphipathicity

N. V. Amirkhanov*, #, A. V. Bardasheva*, V. N. Silnikov*, and N. V. Tikunova*

Phone: +7 (383) 363-51-35; e-mail: nariman@niboch.nsc.ru

* Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of RAS,
prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

A number of histidine-containing synthetic antifungal peptides with a “linear” type of amphipathicity (SAMP LTA) (**F2H_x**, **H10F2**, **H10**, where $x = 7, 10, 13$ and 16) have been synthesized and studied. Biological screening of such histidine-containing peptides for their antifungal and hemolytic activity was carried out. It has been shown that the presented histidine-containing SAMP LTAs are capable of effectively inhibiting the growth of opportunistic fungi *Candida albicans* and have low hemolytic activity in most cases not exceeding 10% even at their relatively high concentration of 400 μM in a medium containing erythrocytes. The antifungal activity of the studied peptides increases with increasing histidine residues in their composition, reaching the maximum value for the histidine-containing peptide **F2H16** ($\text{MIC}_{50} = 1.0 \mu\text{M}$). It has been shown that as the chain length of peptides increases, their hemolytic toxicity also increases. In terms of therapeutic significance, the optimal peptides in the presented series of peptides were **F2H10** and **F2H13**, which have higher selectivity than the short or longer peptides **F2H7** or **F2H16**. The therapeutic index (TI) for these peptides was 233, 247, 79 and 60, respectively. It has been shown that histidine-containing derivatives of peptides with phenylalanine residues at the N-terminus of the peptide (**F2H10**) are less effective compared to similar peptides (**H10F2**) containing phenylalanine residues at the C-terminus. Among all the studied peptides, the most active was the **H10** peptide ($\text{MIC}_{50} = 0.7 \mu\text{M}$), which does not contain phenylalanine residues, which in its antifungal activity is not only more effective than all other histidine-containing peptides, including the **F2H16** peptide with 16 histidine residues, but also 4-5 times more effective than the antifungal peptide **P113** ($\text{MIC}_{50} = 3.4 \mu\text{M}$), a short active fragment of natural histatin 5, well known in the literature. Due to its relatively low hemolytic and high antifungal activity, the presented histidine-containing SAMP LTAs have relatively high TI values, more than 60. Among all the studied peptides, peptides **H10** and **P113** have minimal, almost zero, hemolytic activity. However, due to its higher antifungal activity, the selectivity of peptide **H10** ($\text{TI} > 1400$) exceeds that of peptide **P113** ($\text{TI} > 340$) by more than 4 times. Thus, peptide **H10**, due to its high antifungal activity, low hemolytic toxicity and, accordingly, high therapeutic significance, can be used as a promising antifungal peptide drug.

Keywords: synthetic antimicrobial peptides, amphiphilicity, “linear” type of amphipathicity, “circular” type of amphipathicity, histidine-containing peptides, P113 peptide, antifungal activity, *Candida albicans*, hemolytic activity, selectivity



УДК 577.113.4

ФОТОРАСЩЕПЛЯЕМЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК ДЛЯ ФОТОРЕГУЛИРУЕМОЙ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9

© 2024 г. Е. А. Ахметова*, И. П. Вохтанцев*, **, М. И. Мещанинова*, М. А. Воробьева*,
Д. О. Жарков*, **, Д. С. Новопашина*, **, #

* Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

** Новосибирский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 1

Поступила в редакцию 13.11.2023 г.

После доработки 26.11.2023 г.

Принята к публикации 27.11.2023 г.

Создание систем редактирования генома на основе CRISPR/Cas с повышенной эффективностью и специфичностью, а также возможностью регуляции действия путем облучения светом представляет собой актуальную задачу. Перспективный способ решения этой задачи – модификация компонентов систем CRISPR/Cas, в частности направляющих РНК, путем введения фоторасщепляемых линкеров. Мы разработали подход к получению фоторасщепляемых направляющих sgРНК (single guide RNA) для системы CRISPR/Cas9, содержащих линкеры на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола. При облучении УФ-светом такие направляющие РНК разрушаются, и происходит “выключение” системы CRISPR/Cas9. Нами получено три варианта фотомодифицированных sgРНК с различным расположением фотолинкера. Показано, что sgРНК, в которой фотолинкер расположен в области связывания с белком Cas9 и формирования шпильки, способна эффективно направлять белок Cas9 для расщепления ДНК-мишени до облучения УФ-светом и утрачивает свою активность после облучения. Выбраны условия для контролируемого расщепления 40% модельной ДНК-мишени. Разработанный подход обеспечивает специфическую инактивацию системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 в заданный момент времени в определенном месте. Фоторегуляция геномного редактирования позволит не только снизить нежелательные нецелевые эффекты, но также может стать основой для лечения ряда генетических заболеваний.

Ключевые слова: регулируемая система CRISPR/Cas9, УФ-облучение, направляющие sgРНК, фоторасщепляемый линкер

DOI: 10.31857/S0132342324040147, **EDN:** MWHLXY

ВВЕДЕНИЕ

CRISPR-системы (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) – кластеризованные, регулярно распределенные короткие палиндромные повторы, разделенные уникальными последовательностями (спейсерами), которые заимствуются из чужеродных генетических фрагментов (бактерио-

фагов) и обеспечивают противовирусную защиту бактерий [1, 2]. Вблизи этих повторов расположены белок-кодирующие CRISPR-ассоциированные гены (Cas). В настоящее время для редактирования генома широко используется система CRISPR/Cas9, которая состоит из белка Cas9 *Streptococcus pyogenes* и двух РНК: crРНК, узнающей чужеродную ДНК по принципу комплемен-

Сокращения: CRISPR – регулярно расположенные кластеры коротких палиндромных повторов (clustered regularly interspaced short palindromic repeats); Cas9 – CRISPR-ассоциированный белок (CRISPR associated protein 9); crРНК – CRISPR РНК; PAM – мотив, прилегающий к протоспейсеру (protospacer adjacent motif); PL – фоторасщепляемый линкер на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола; sgРНК – единая направляющая РНК (single guide RNA); siРНК – малые интерферирующие РНК; tracrРНК – транс-активирующая crРНК (trans-activating crRNA).

Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-51-29; эл. почта: danov@niboch.nsc.ru).

тарности, и *tracr*РНК, связывающейся с *cr*РНК и белком Cas9. Вместо пары *cr*РНК и *tracr*РНК можно использовать специально сконструированную молекулу единой направляющей РНК (*sg*РНК), содержащую фрагмент, обеспечивающий узнавание ДНК, и фрагмент, обеспечивающий связывание с белком Cas9 [3–5]. В процессе узнавания комплекс РНК и белка Cas9 находит в дуплетной ДНК-мишени последовательности PAM (Protospacer Adjacent Motif). Затем ДНК вблизи PAM частично раскручивается, и образуется дуплекс между *cr*РНК и ДНК-мишенью, после чего вступают в действие нуклеазные домены белка Cas9, которые разрезают обе цепи ДНК.

Известно множество примеров использования синтетических направляющих РНК в составе системы CRISPR/Cas9 для редактирования генома [6]. Для контролируемого включения системы геномного редактирования предложено использовать фотоблокированные РНК [7–10].

Важная для практического применения задача – создание систем редактирования генома на основе CRISPR/Cas, которые обладали бы повышенной эффективностью и специфичностью действия одновременно с дополнительной возможностью регуляции активности на уровне направляющей РНК путем облучения светом. Перспективный способ решения этой задачи – модификация компонентов систем CRISPR/Cas, в частности направляющих РНК [9, 10].

Описанные в литературе фоторегулируемые системы активируются путем облучения, но их невозможно инактивировать при необходимости в определенный момент времени. При этом задача остановки системы CRISPR/Cas9 внутри клеток весьма актуальна для снижения нецелевого редактирования, а также для разработки средств генной терапии заболеваний, вызванных увеличением числа копий определенных генов, когда требуется отредактировать только часть геномных локусов. Для решения этой проблемы предложено несколько подходов, основанных на использовании белков Cas9, способных к регулируемой димеризации [11, 12], или на индуцируемой деструкции самой кодирующей последовательности Cas9 [13, 14].

В данной работе мы предлагаем использовать фоторасщепляемые направляющие РНК, которые позволяли бы инактивировать систему геномного

редактирования CRISPR/Cas9 при облучении светом ближнего УФ-диапазона. Предложенный подход расширяет арсенал направляющих РНК, способных инактивировать систему геномного редактирования CRISPR/Cas9 и дает возможность специфической инактивации системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 в определенный момент времени в живых клетках.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Несомненное преимущество использования фотолabile соединений – неинвазивность методов регуляции биологических процессов, а также высокое пространственно-временное разрешение экспериментов с их участием. Привлекательность использования таких соединений подтверждена многочисленными исследованиями, в которых различные фотолabile группы включены в конструкции на основе олигонуклеотидов.

Для получения фоторасщепляемых направляющих *sg*РНК нами был разработан подход, основанный на введении в состав РНК фоторасщепляемых линкеров на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола (PL) в определенные положения олигонуклеотидной цепи. Для этого нами был синтезирован фосфитамид 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола, как описано ранее [15]. Твердофазным фосфитамидным методом были синтезированы 102-звенная *sg*РНК и три ее фотомодифицированных аналога (*sg*RNA-PL1, *sg*RNA-PL2, *sg*RNA-PL3), содержащие фотолинкер в районе протоспейсера, связывающей петли и шпилек в структуре *sg*РНК. Протоколы синтеза олигорибонуклеотидов были оптимизированы с учетом их протяженности. Для повышения выходов целевых соединений при синтезе полноразмерных *sg*РНК на отечественном синтезаторе ASM-800 в качестве активатора на стадии конденсации использовали модифицированный тетразол, а именно 5-[3,5-*бис*(трифторметил)фенил]-1*H*-тетразола (Активатор 42TM), для кэпирования применяли пропионовый ангидрид. Время конденсации и объемы растворов фосфитамида и конденсирующего реагента увеличивали с ростом олигонуклеотидной цепи. Для введения фотолинкера использовали более концентрированный раствор фосфитамида по сравнению со стандартными рибонуклеотидами, а время конденсации увеличивали до 30 мин.

Время постсинтетических обработок при деблокировании было увеличено на 25% по сравнению со стандартным протоколом. Время обработки 40%-ным раствором метиламина увеличивали до 20 мин, а удаление 2'-*трет*-бутилдиметилсилильных групп проводили в течение 2 ч вместо 1.5 ч при стандартном деблокировании. Выделение sgPHK осуществляли путем препаративного электрофореза в 12%-ном денатурирующем ПААГ. Все эти изменения позволили успешно получить протяженные 102-звенные олигорибонуклеотиды и выделить целевые sgPHK в количествах, достаточных для проведения экспериментов.

Описанным выше способом были получены три варианта фотомодифицированных sgPHK (sgRNA-PL1, sgRNA-PL2, sgRNA-PL3) (табл. 1). Дополнительно для сравнения были синтезированы олигорибонуклеотиды sgRNA-PL2 (5'fr_sgRNA-PL2 и 3'fr_sgRNA-PL2) и sgRNA-PL3 (5'fr_sgRNA-PL3), соответствующие фрагментам PHK, которые должны формироваться после об-

лучения sgRNA-PL2 и sgRNA-PL3 соответственно. В качестве контрольных были синтезированы немодифицированная sgPHK, а также пара направляющих PHK crPHK и tracrPHK. Последовательности полученных олигорибонуклеотидов представлены в табл. 1.

На первом этапе проводили сравнительное изучение способности фотомодифицированных и контрольных немодифицированных направляющих PHK индуцировать расщепление плазмидной ДНК-мишени pBluescriptII SK(-) белком Cas9. Плазида pBS2SKM содержала протоспейсерную последовательность и PAM (5'-TGG-3'). В ходе эксперимента фототабильные направляющие PHK sgRNA-PL1, sgRNA-PL2 и sgRNA-PL3 предварительно облучали УФ-светом (365 нм) в течение 30 мин. Длительность облучения подбирали так, чтобы происходило количественное расщепление PL в составе PHK. Затем использовали их в реакции направленного расщепления ДНК нуклеазой Cas9, при этом для сравнения иссле-

Таблица 1. Фототабильные направляющие sgPHK, их немодифицированные аналоги и фрагменты

sgPHK	Последовательность
sgRNA	5'- <u>GGAUAACUC</u> AAUUUGUAAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU-AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU-3'
crRNA	5'- <u>AUAACUC</u> AAUUUGUAAAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG-3'
tracrRNA	5'-AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU-3'
sgRNA-PL1	5'- <u>GGAUAACUC</u> AAUUUGU- PL -AAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG-GUGCUUUU-3'
sgRNA-PL2	5'- <u>GGAUAACUC</u> AAUUUGUAAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCA- PL -AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG-GUGCUUUU-3'
sgRNA-PL3	5'- <u>GGAUAACUC</u> AAUUUGUAAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU-AAGGCUAGUCCGUUAUC- PL -AACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU-3'
5'fr_sgRNA-PL2	5'- <u>GGAUAACUC</u> AAUUUGUAAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCA-3'
3'fr_sgRNA-PL2	5'-AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG-GUGCUUUU-3'
5'fr_sgRNA-PL3	5'- <u>GGAUAACUC</u> AAUUUGUAAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU-AAGGCUAGUCCGUUAUC-3'

Примечание: подчеркнута нуклеотидная последовательность, участвующая в образовании дуплекса с ДНК-мишенью. **PL** – фоторасщепляемый линкер на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола.

довали также расщепление ДНК-мишени в присутствии необлученных фотолабильных направляющих РНК (рис. 1).

По результатам электрофоретического анализа можно заключить, что введение фотолинкера в положение 1 (sgRNA-PL1) значительно уменьшает эффективность расщепления дцДНК по сравнению

с контрольной немодифицированной sgРНК, что, вероятно, связано с нарушением структуры гетеродуплекса между sgРНК и ДНК-мишенью (рис. 2). При введении фотолинкера в положение 2 (sgRNA-PL2) эффективность расщепления остается достаточно высокой, а при локализации в положении 3 (sgRNA-PL3) практически не от-

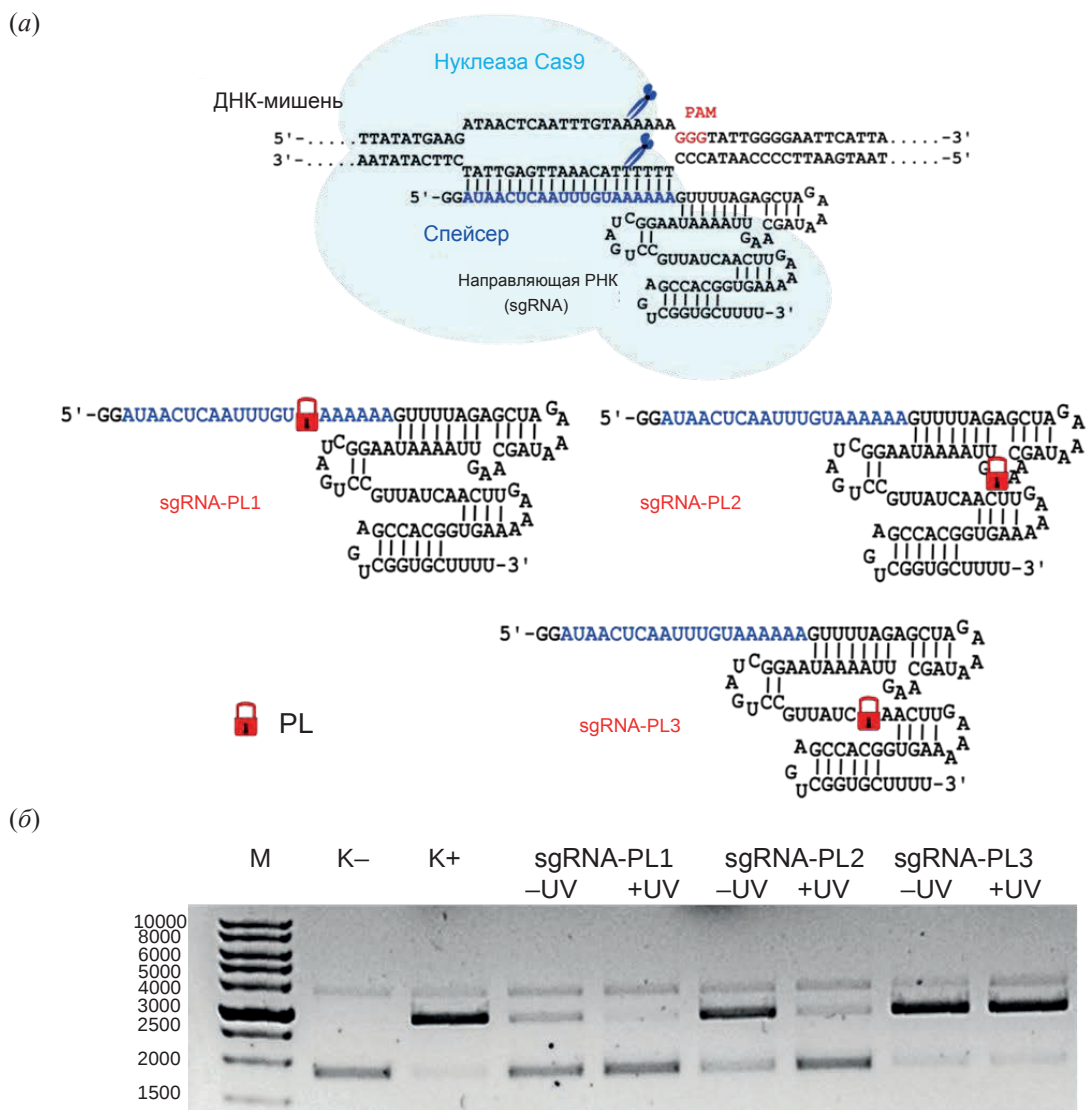


Рис. 1. Расщепление плазмиды pBluescriptII SK(–) системой CRISPR/Cas9. (а) – Схематическое изображение комплекса ДНК-мишени и немодифицированной sgРНК с белком Cas9 и последовательности фотолабильных направляющих РНК sgRNA-PL1, sgRNA-PL2 и sgRNA-PL3; (б) – электрофоретический анализ продуктов расщепления в 1%-ном агарозном геле. М – маркер длины ДНК, K[–] – исходная кольцевая суперскрученная плазмидная ДНК-мишень, содержащая незначительное количество ДНК в релаксированной форме; K⁺ – продукты расщепления ДНК-мишени в присутствии немодифицированной химически синтезированной 102-звенной sgRNA; остальные дорожки – анализ продуктов расщепления ДНК-мишени в присутствии облученных (+UV) и необлученных (–UV) фотолабильных направляющих РНК (sgRNA-PL1, sgRNA-PL2 или sgRNA-PL3). Время реакции 60 мин, температура 37°C. Условия проведения реакции см. в “Эксперим. части”.

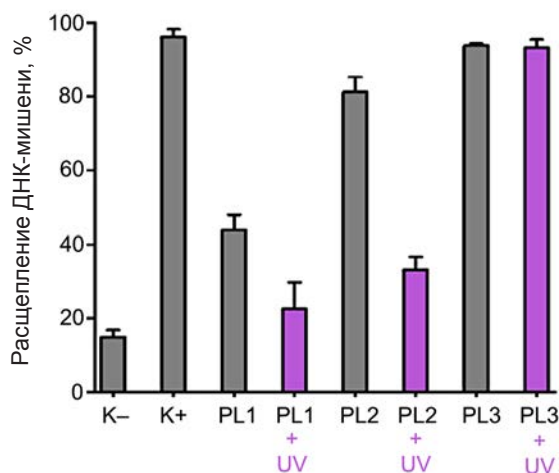


Рис. 2. Анализ эффективности расщепления дцДНК-мишени системой CRISPR/Cas9, содержащей фотолabile направляющие РНК, до и после облучения. Условия расщепления см. в “Эксперим. части”. Данные получены усреднением результатов не менее трех независимых экспериментов.

личается от контроля. Облучение существенно снижает эффективность расщепления для sgRNA-PL1 и sgRNA-PL2, но практически не изменяет картину расщепления для sgRNA-PL3. Этот факт может свидетельствовать о том, что соответствующий участок 3'-концевой области sgРНК не играет существенную роль в расщеплении ДНК-мишени в данных условиях.

Таким образом, среди исследованных вариантов расположения фотолинкера в составе направляющей РНК наиболее выгодным является положение 2, которое обеспечивает эффективное расщепление до облучения и значительное снижение степени расщепления после облучения. Поэтому для дальнейших исследований была выбрана направляющая РНК sgRNA-PL2.

С целью проверки гипотезы о сниженной способности sgRNA-PL2 направлять нуклеазу Cas9 на ДНК-мишень после облучения проводили исследование расщепления мишени в присутствии олигорибонуклеотидов 5'fr_sgRNA-PL2 и 3'fr_sgRNA-PL2 (43 и 59 нт соответственно), которые соответствуют фрагментам молекулы sgRNA-PL2, теоретически образующимся в результате расщепления фотолинкера. Кроме того, для проверки предположения о незначительной роли 3'-концевой области sgRNA-PL3 для функцио-

нирования системы CRISPR/Cas9 *in vitro* мы исследовали способность олигонуклеотида 5'fr_sgRNA-PL3, соответствующего теоретически образующемуся при облучении 5'-фрагменту sgRNA-PL3, индуцировать Cas9-опосредованное расщепление ДНК.

Электрофоретический анализ продуктов расщепления плазмиды в агарозном геле подтвердил первоначальные предположения. Было показано, что в присутствии химически синтезированных фрагментов фоторасщепляемой направляющей РНК sgRNA-PL2 эффективность расщепления ДНК нуклеазой Cas9 значительно ниже по сравнению с немодифицированной sgРНК (рис. 3а, 3в). При этом эффективность расщепления ДНК в присутствии 5'-концевого фрагмента sgRNA-PL3 белком Cas9 не уступает эффективности расщепления в присутствии немодифицированной sgРНК в использованных условиях (рис. 3б, 3в).

Полученные результаты показывают, что выбранное положение для введения фотолинкера в направляющей РНК sgRNA-PL2 в петле между верхним и нижним стеблем в области связывания с белком Cas9 является критическим для эффективной работы системы CRISPR/Cas9 и позволяет эффективно выключать систему облучением. Необходимо также отметить, что укороченная до 69 нт направляющая РНК достаточно эффективна для расщепления ДНК-мишени системой CRISPR/Cas9. Данные наших экспериментов по активности систем CRISPR/Cas9, содержащих укороченные sgРНК, согласуются с ранее опубликованными выводами других исследовательских групп о минимальной длине химерной направляющей РНК для нуклеазы Cas9 [16, 17]. Так, в работе Nishimasu et al. [16] 68-звенная sgРНК в составе комплекса с нуклеазой Cas9 была способна направлять расщепление ДНК-мишени.

На следующем этапе проводили сравнение кинетики расщепления ДНК-мишени белком Cas9 в присутствии различных вариантов направляющих РНК. Избыток эффекторного комплекса по отношению к плазмидной ДНК-мишени уменьшали с 50- до 15-кратного по сравнению с предыдущим исследованием эффективности расщепления. Кинетические кривые расщепления плазмиды эффекторным комплексом с немодифицированными направляющими РНК, в том числе

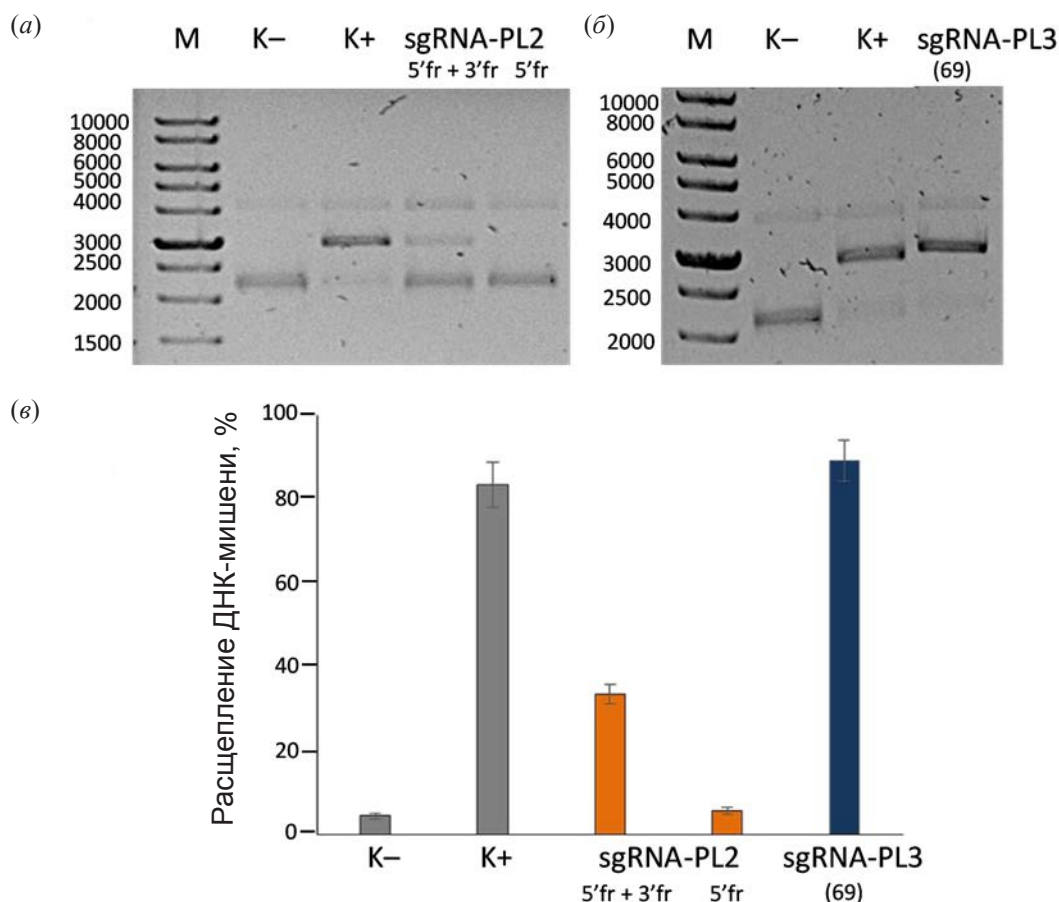


Рис. 3. Электрофоретический анализ продуктов расщепления плазмиды pBluescriptII SK(–) в присутствии фрагментов sgРНК в 1%-ном агарозном геле. М – маркер длины ДНК, К– – исходная кольцевая суперскрученная плазмидная ДНК-мишень, содержащая незначительное количество ДНК в релаксированной форме; К+ – продукт расщепления ДНК-мишени в присутствии немодифицированной химически синтезированной sgРНК; (а) – sgRNA-PL2 – продукты расщепления ДНК-мишени в присутствии 5'fr_sgRNA-PL2 и 3'fr_sgRNA-PL2 (5'fr + 3'fr) или только 5'fr_sgRNA-PL2 (5'fr); (б) – sgRNA-PL3 (69) – продукты расщепления ДНК-мишени в присутствии 69-звенного 5'-фрагмента sgRNA-PL3; (в) – анализ эффективности расщепления плазмиды нуклеазой Cas9 в присутствии фрагментов sgРНК. Условия расщепления см. в “Эксперим. части”. Данные получены усреднением результатов не менее двух независимых экспериментов.

с укороченным 69-нуклеотидным вариантом, представлены на рис. 4.

Укороченная 69-звенная sgРНК спустя 40 мин реакции позволила достичь 90%-ного расщепления мишени, как и пара направляющих crРНК–tracrРНК. Однако при этом константа скорости расщепления для 69-звенного фрагмента оказалась значительно ниже ($k_{\text{sgРНК}(69)} = 0.09 \pm 0.01 \text{ мин}^{-1}$, $k_{\text{crРНК:tracrРНК}} = 1.47 \pm 0.02 \text{ мин}^{-1}$, $k_{\text{sgРНК}(102)} = 0.57 \pm 0.01 \text{ мин}^{-1}$). Возможно, это связано с тем, что при использовании укороченной sgРНК доля продуктивного комплекса Cas9/РНК сравнима с долей продуктивного комплекса в присутствии

полноразмерных направляющих РНК, но скорость расщепления значительно снижается из-за отсутствия дополнительных взаимодействий белка с 3'-концевыми шпильками tracrРНК или sgРНК.

С учетом описанных выше результатов по расщеплению плазмидной ДНК белком Cas9 в присутствии фоточувствительных направляющих РНК, для исследования кинетики расщепления ДНК-мишени была выбрана sgRNA-PL2. Полученные для нее кинетические кривые расщепления плазмидной ДНК представлены на рис. 5.

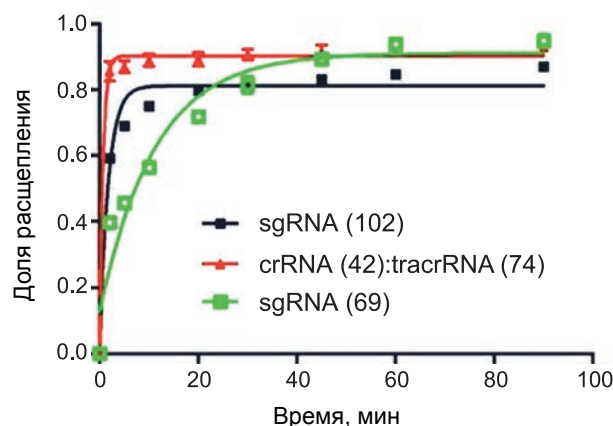


Рис. 4. Кинетические кривые расщепления ДНК-мишени комплексами Cas9 с направляющими немодифицированными РНК, полученные путем обработки данных электрофоретического анализа реакционных смесей в агарозном геле с визуализацией бромистым этидием. Условия расщепления см. в “Эксперим. части”. Данные получены усреднением результатов не менее трех независимых экспериментов.

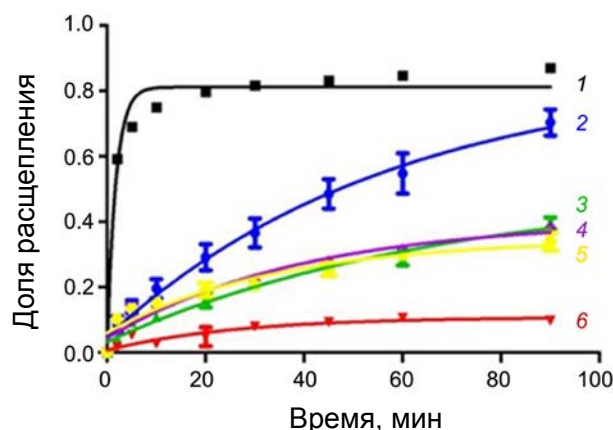


Рис. 5. Кинетические кривые расщепления ДНК-мишени комплексом белка Cas9 с sgRNA-PL2. 1 – контрольная РНК (sgRNA), 2 – фоточувствительная РНК (sgRNA-PL2), 3 – дезактивированная фоточувствительная РНК в комплексе с Cas9, 4 – остановка реакции УФ-облучением (30 мин) с 5-й минуты от начала реакции, 5 – остановка реакции УФ-облучением (5 мин) с 5-й минуты от начала реакции, 6 – дезактивированная вне комплекса с Cas9 фоточувствительная РНК. Условия расщепления см. в “Эксперим. части”. Данные получены усреднением результатов не менее трех независимых экспериментов.

Наиболее быстро и эффективно происходит расщепление плазмиды нуклеазой Cas9 в присутствии немодифицированной sgРНК. Действие системы с использованием sgRNA_PL2 удалось остановить так, чтобы конечная доля расщепленной плазмиды составляла не более 40% (рис. 5,

кривые 4 и 5). При этом облучение реакционной смеси проводили с 20-й минуты от начала реакции вследствие более медленного протекания реакции расщепления плазмиды. Отметим, что увеличение продолжительности облучения с 5 до 30 мин не приводило к дополнительному снижению скорости и эффективности расщепления – ход соответствующих кривых 4 и 5 на рис. 5 практически совпадает. Интересно, что облучение sgРНК вне комплекса с белком Cas9 позволяет более эффективно ингибировать расщепление ДНК-мишени нуклеазой Cas9, т.к. приводит к полному расщеплению фотомодифицированной sgРНК (рис. 5, кривая 6), в отличие от облучения в составе комплекса (рис. 5, кривая 3). Этот эффект, вероятно, связан с частичным экранированием РНК внутри комплекса от УФ-излучения.

Таким образом, полученные результаты о кинетике расщепления плазмиды белком Cas9 в составе эффекторного комплекса с направляющими фоточувствительными РНК подтверждают возможность выключения системы CRISPR/Cas9 путем облучения в определенный момент времени.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реактивы: *N,N'*-дисукцинимидилкарбонат, *N*-метилимидазол, пропионовый ангидрид (Acros Organics, США), 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфитамид, 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-дезоксириботимидин, 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-*N*-ацетилзащищенные 2'-*O*-*mpet*-бутилдиметилсилилрибонуклеозид-3'-фосфитамида, а также твердофазные носители с присоединенным первым нуклеозидным звеном – 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-*mpet*-бутилдиметилсилил-*N*4-ацетилцитидин-CPG, 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-*mpet*-бутилдиметилсилил-*N*6-ацетиладенозин-CPG и 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-*mpet*-бутилдиметилсилилуридин-CPG (ChemGenes, США); краситель Stains-all, персульфат аммония, дихлоруксусную кислоту, акриламид, *N,N'*-метиленисакриламид, 2,6-лутидин, бромистый этидий, солянокислый цистеин, трисгидроксиметиламинометан (Fluka, Швейцария); мочевины, 40%-ный водный раствор метиламина, нингидрин (Merck, Германия); молекулярные сита Trap-Pac™ Molecular Sieve Bag 3 Å (Millipore, США); агарозу (MP, США); пиридин, ацетон, тетрагидрофуран

(PanReac, Испания); ксиленцианол FF, бромфеноловый синий, *N,N,N',N'*-этилендиаминтетрауксусную кислоту (Serva, Германия); 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиол, триэтиламин, триэтиламинтригидрофторид, этокситриметилсилан, 5-[3,5-бис(трифторметил)фенил]-1H-тетразол (Активатор 42TM), хлористый метилен, ацетонитрил (Sigma-Aldrich, США); иод кристаллический, формамид, гексан, концентрированную серную кислоту (Реахим, Россия); ацетонитрил (Криохром, Россия), а также другие реактивы и растворители отечественного и зарубежного производства. PL получали, как описано нами ранее [15].

Рекомбинантная эндонуклеаза Cas9 и плазида pBS2SKM на основе вектора pBluescript II SK(–) со вставкой протоспейсерной последовательности и РАМ (5'-TGG-3') получены согласно стандартному протоколу [15, 18].

Синтез фоторасщепляемых олигорибонуклеотидов. Олигонуклеотиды были получены на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия) твердофазным фосфитамидным методом синтеза в масштабе 0.4 мкмоль согласно оптимизированному для данного прибора синтетическому протоколу. Фосфитамиды рибонуклеотидов использовали в концентрации 0.1 М в абсолютном ацетонитриле, время конденсации составило 5 мин. Фосфитамид фоторасщепляемого линкера (PL) использовали в концентрации 0.15 М в абсолютном ацетонитриле, время конденсации составляло 30 мин. В качестве конденсирующего реагента использовали 0.25 М раствор 5-[3,5-бис(трифторметил)фенил]-1H-тетразола (Активатор 42TM) в абсолютном ацетонитриле. С ростом олигонуклеотидной цепи время конденсации и объемы растворов фосфитамида и конденсирующего реагента увеличивали на 15% после 50, 70 и 90 синтетических циклов. Смеси (v/v) пропионовый ангидрид/2,6-лутидин/тетрагидрофуран (10 : 10 : 80) и *N*-метилимидазол/тетрагидрофуран (16 : 84) применяли в качестве эпирующих реагентов. Окисление проводили 0.02 М иодом в смеси пиридин/вода/тетрагидрофуран (1 : 9 : 90). В качестве детритилирующего реагента использовали дихлоруксусную кислоту (3%) в хлористом метиле.

Для деблокирования гетероциклических оснований, удаления цианоэтильных защитных групп с межнуклеотидных фосфатных групп и отделения

олигорибонуклеотидов от твердофазного носителя использовали обработку 40%-ным раствором метиламина в течение 20 мин при 65°C и постоянном перемешивании. Охлаждали в течение 10 мин при –20°C. Полимерный носитель промывали раствором ацетонитрил/этанол/вода (1 : 1 : 1, v/v/v). Растворы объединяли и упаривали досуха.

Для удаления 2'-OTBDMS защитных групп с олигорибонуклеотида к сухому остатку сразу после упаривания добавляли 250 мкл свежеприготовленного раствора NMP/Et₃N/Et₃N·3HF (1.5 : 0.75 : 1, v/v/v) и выдерживали в течение 2 ч при 65°C и перемешивании. Далее к полученному раствору добавляли 375 мкл этокситриметилсилана и перемешивали на термомиксере в течение 10 мин при 25°C. К полученной смеси добавляли 1 мл серного эфира, перемешивали, центрифугировали, удаляли надосадочную жидкость, после чего осадок промывали серным эфиром и высушивали на воздухе.

Выделение целевых олигомеров проводили с использованием препаративного гель-электрофореза в денатурирующих условиях (12%-ный ПААГ, акриламид : *N,N'*-метиленбисакриламид 30 : 0.5, 7 М мочеви́на, 50 мМ Трис-Н₃ВО₃, pH 8.3, 0.1 М Na₂ЭДТА). Визуализацию олигонуклеотидов в геле проводили наложением геля на пластину DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия) в свете УФ-лампы ($\lambda = 254$ нм). В случае фоточувствительных олигонуклеотидов во избежание активации реакции расщепления под воздействием УФ-излучения закрывали стеклом основную часть геля, содержащую продукт, оставляя только небольшую его часть, достаточную для визуализации и аппроксимации. Измельченный гель, содержащий олигонуклеотидный материал, помещали в пробирку типа Эппендорф на 1.5 мл, содержащую 1 мл 0.3 М раствора ацетата натрия (pH 5.2), и перемешивали на термомиксере Thermomixer Comfort (Eppendorf, Германия) в течение 16 ч при 25°C. Олигорибонуклеотиды после элюции осаждали из 0.3 М раствора ацетата натрия четырехкратным объемом этилового спирта, выдерживая при –20°C в течение 2–12 ч. Супернатант после центрифугирования отбирали, осадок промывали охлажденным 80%-ным этиловым спиртом и высушивали досуха на воздухе.

Гомогенность полученных олигонуклеотидов подтверждали методом аналитического гель-

электрофореза в 12%-ном ПААГ (условия см. выше). Для нанесения на гель использовали 5 мкл раствора 7 М мочевины с содержанием 0.025% ксиленианолового FF. Для визуализации олигонуклеотидов использовали раствор красителя Stains-all, приготовленный из 50 мг красителя Stains-all и 100 мл смеси вода/формамид (1 : 1, v/v). После окрашивания гели высушивали на приборе Gel Dryer model 583 (Bio-Rad, США).

Расщепление плазмидной ДНК белком Cas9 в присутствии направляющих РНК. Реакцию проводили в 10 мкл раствора, содержащего 20 mM HEPES (pH 7.5), 100 mM KCl, 1 mM дитиотреит, 0.5 mM Na₂ЭДТА, 2 mM MgCl₂, 5% глицерина. Контрольный раствор содержал все компоненты, кроме направляющей РНК и белка Cas9. К 2 мкл буфера (5×) добавляли 1.35 мкл (1 мкМ, 1.35 пмоль) направляющей РНК и 0.6 мкл раствора белка Cas9 (2.24 мкМ, 1.35 пмоль) в 50-кратном избытке по отношению к плазмиде pBS2SKM. Объем доводили до 9 мкл водой. Растворы перемешивали и инкубировали 15 мин при 37°C для сборки рибонуклеопротеинового комплекса. Аналогичным образом готовили растворы, содержащие дезактивированные УФ-облучением в течение 30 мин ($\lambda = 365$ нм) направляющие sgРНК.

Затем в каждую пробирку добавляли 1 мкл раствора (50 нг/мкл, 27 фмоль) плазмиды pBS2SKM, содержащей протоспейсер и последовательность РАМ. Реакционные смеси перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при 37°C в условиях отсутствия прямого солнечного света.

Для остановки реакции к реакционной смеси добавляли 2.5 мкл раствора, содержащего 250 mM Na₂ЭДТА, 1.2% SDS, 0.01% бромфенолового синего и 30% глицерина (Quenching buffer).

Эффективность реакции расщепления плазмиды белком Cas9 в присутствии направляющих РНК анализировали методом гель-электрофореза в 1%-ном агарозном геле в ТАЕ-буфере (4 mM Трис, 3 mM CH₃COOH, 0.07 mM Na₂ЭДТА) с добавлением 2.5 мкл бромида этидия (концентрация – 10 мг/мл). На гель наносили 10 мкл реакционной смеси в Quenching buffer. Для контроля подвижности в геле продуктов расщепления использовали ДНК-маркер 1 kb, длина фрагментов 250–10000 п.н. (СибЭнзим, Россия). Визуализацию проводили с использованием системы геледокументации Quantum (Vilber Lourmat, Франция).

Для получения количественных характеристик изображения переводили в цифровую форму в программном пакете Quantity One (Bio-Rad, США).

Долю расщепления плазмиды рассчитывали по следующим формулам в программном продукте Microsoft Excel:

$$N_{\Sigma} = \frac{I_{\text{лин}} + I_{\text{рел}}}{I_{\text{лин}} + I_{\text{рел}} + I_{\text{суперск}}/k} \cdot 100\%,$$

$$N_{dsDNA} = \frac{I_{\text{лин}}}{I_{\text{лин}} + I_{\text{рел}} + I_{\text{суперск}}/k} \cdot 100\%,$$

$$N_{ssDNA} = \frac{I_{\text{рел}}}{I_{\text{лин}} + I_{\text{рел}} + I_{\text{суперск}}/k} \cdot 100\%,$$

где N_{Σ} – суммарное расщепление плазмиды; N_{dsDNA} – расщепление двух цепей ДНК плазмиды; N_{ssDNA} – расщепление одной цепи ДНК плазмиды; $I_{\text{лин}}$ – интенсивность полосы, соответствующей линейной форме плазмиды; $I_{\text{рел}}$ – интенсивность полосы, соответствующей релаксированной форме плазмиды; $I_{\text{суперск}}$ – интенсивность полосы, соответствующей суперскрученной форме плазмиды; $k = 1.14$ – коэффициент эффективности окрашивания суперскрученной формы ДНК относительно релаксированной формы [19].

Кинетика расщепления плазмидной ДНК белком Cas9 в присутствии направляющих РНК.

Реакцию проводили в 85 мкл раствора, содержащего 20 mM HEPES (pH 7.5), 100 mM KCl, 1 mM дитиотреит, 0.5 mM Na₂ЭДТА, 2 mM MgCl₂, 5% глицерина. К 17 мкл буфера добавляли 3.5 мкл (1 мкМ, 3.5 пмоль) направляющей sgРНК и 1.56 мкл раствора белка Cas9 (5.8 мкМ, 3.50 пмоль) в 15-кратном избытке по отношению к плазмиде pBS2SKM, доводили объем до 70 мкл водой. Растворы перемешивали и инкубировали 15 мин при 37°C. Затем в каждую пробирку добавляли 8.5 мкл раствора (50 нг/мкл, 0.233 пмоль) плазмиды pBS2SKM. Реакционные смеси перемешивали и инкубировали в течение 1.5 ч при 37°C в условиях отсутствия прямого солнечного света. Для остановки реакции отбирали аликвоты по 10 мкл через 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60 и 90 мин после начала реакции и добавляли их в пробирки с 2.5 мкл Quenching buffer.

Результаты реакции анализировали в 1%-ном агарозном геле, как описано выше. Для получения количественных характеристик изображения

переводили в цифровую форму в программном пакете Quantity One (Bio-Rad, США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе разработан подход к получению фоторасщепляемых направляющих sgРНК для системы CRISPR/Cas9, содержащих линкеры на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола. С использованием предложенного подхода нами были получены три варианта фотомодифицированных sgРНК с различным расположением фотолинкера и показано, что облучении УФ-светом такие направляющие РНК разрушаются.

В результате исследований выявлена оптимальная локализация фотолинкера в составе направляющей sgРНК, позволяющая регулировать активность системы CRISPR/Cas9 путем ее облучения. Такие sgРНК в составе комплекса с нуклеазой Cas9 эффективно направляют систему для расщепления ДНК-мишени до облучения и дают возможность ее инактивации после УФ-облучения. Выбран режим облучения для достижения 40%-ного уменьшения количества ДНК-мишени в результате действия созданной нами фотомодифицированной системы CRISPR/Cas9. Сочетание короткого времени облучения и использования света в ближней части УФ-диапазона, который гораздо более безопасен для клеток, чем УФ-В, УФ-С и дальний УФ-А [20, 21], открывает перспективу использования фотоинактивируемых sgРНК *in vivo*.

Подтверждена возможность удаления 3'-концевого фрагмента sgРНК без критического снижения ее функциональной активности. Укороченные до 69 звеньев sgРНК можно использовать для расщепления ДНК-мишеней: хотя скорость такого расщепления ниже, чем в случае полно-размерных sgРНК, предельная степень расщепления практически не снижается.

Полученные в работе результаты подтверждают возможность создания фоточувствительной системы редактирования генома CRISPR/Cas9 с использованием фоторасщепляемых линкеров в структуре направляющих РНК. Разрушение направляющей РНК в определенный момент времени позволит снизить вероятность нецелевых эффектов при редактировании генов. В дальнейшем данная стратегия может быть применена для лечения ряда генетических заболеваний, ко-

торые обусловлены наличием “лишних” копий определенного гена. К таким патологиям относятся, например, синдром Шарко–Мари–Тута, причиной которого может служить лишняя копия гена периферического белка миелина RMP22. Подход к светозависимому “выключению” активности CRISPR-системы предложен нами впервые.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00294) и базового бюджетного финансирования в рамках проекта государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (2021–2024 гг.) № 121031300042-1.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang J.Y., Pausch P., Doudna J.A. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2022. V. 20. P. 641–656.
<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00739-4>
2. Makarova K.S., Wolf Y.I., Iranzo J., Shmakov S.A., Alkhnbashi O.S., Brouns S.J.J., Charpentier E., Cheng D., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Scott D., Shah S.A., Siksnys V., Terns M.P., Venclovas Č., White M.F., Yakunin A.F., Yan W., Zhang F., Garrett R.A., Backofen R., van der Oost J., Barrangou R., Koonin E.V. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2020. V. 18. P. 67–83.
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
3. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. // *Science*. 2012. V. 337. P. 816–821.
<https://doi.org/10.1126/science.1225829>
4. Wang J.Y., Doudna J.A. // *Science*. 2023. V. 379. P. 8643.
<https://doi.org/10.1126/science.add8643>
5. Li T., Yang Y., Qi H., Cui W., Zhang L., Fu X., He X., Liu M., Li P.-F., Yu T. // *Sig. Transduct. Target. Ther.* 2023. V. 8. P. 36.
<https://doi.org/10.1038/s41392-023-01309-7>

6. *Filippova J., Matveeva A., Zhuravlev E., Stepanov G.* // *Biochimie*. 2019. V. 167. P. 49–60.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.09.003>
7. *Liu Y., Zou R.S., He S., Nihongaki Y., Li X., Razavi S., Wu B., Ha T.* // *Science*. 2020. V. 368. P. 1265–1269.
<https://doi.org/10.1126/science.aay8204>
8. *Jain P.K., Ramanan V., Schepers A.G., Dalvie N.S., Panda A., Fleming H.E., Bhatia S.N.* // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016. V. 55. P. 12440–12444.
<https://doi.org/10.1002/anie.2016061>
9. *Zhou W., Brown W., Bardhan A., Delaney M., Ilk A.S., Rauen R.R., Kahn S.I., Tsang M., Deiters A.* // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2020. V. 59. P. 8998–9003.
<https://doi.org/10.1002/anie.201914575>
10. *Sun Y.-J., Chen W.-D., Liu J., Li J.-J., Zhang Y., Cai W.-Q., Liu L., Tang X.-J., Hou J., Wang M., Cheng. L.* // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2023. V. 2. P. e202212413.
<https://doi.org/10.1002/anie.202212413>
11. *Zetsche B., Volz S.E., Zhang F.* // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. P. 139–142.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3149>
12. *Nihongaki Y., Kawano F., Nakajima T., Sato M.* // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. P. 755–760.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3245>
13. *Chen Y., Liu X., Zhang Y., Wang H., Ying H., Liu M., Li D., Lui K.O., Ding Q.* // *Mol. Ther.* 2016. V. 24. P. 1508–1510.
<https://doi.org/10.1038/mt.2016.172>
14. *Petris G., Casini A., Montagna C., Lorenzin F., Prandi D., Romanel A., Zasso J., Conti L., Demichelis F., Cereseto A.* // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 15334.
<https://doi.org/10.1038/ncomms15334>
15. *Akhmetova E.A., Golyshev V.M., Vokhtantsev I.P., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., Novopashina D.S.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 496–504.
<https://doi.org/10.1134/S1068162021020023>
16. *Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehata S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O.* // *Cell*. 2014. V. 156. P. 935–949.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
17. *Jiang F., Doudna J.A.* // *Ann. Rev. Biophysics*. 2017. V. 46. P. 505–529.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
18. *Anders C., Jinek M.* // *Methods Enzymol.* 2014. V. 546. P. 1–20.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00001-5>
19. *Shubbsda M.F., Goodisman J., Dabrowiak J.C.* // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 1997. V. 34. P. 73–79.
[https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(96\)01204-3](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(96)01204-3)
20. *Setlow R.B.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1974. V. 71. P. 3363–3366.
<https://doi.org/10.1073/pnas.71.9.3363>
21. *Mullenders L.H.F.* // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2018. V. 17. P. 1842–1852.
<https://doi.org/10.1039/c8pp00182k>

Photocleavable Guide RNA for Photocontrolable CRISPR/Cas9 System

**E. A. Akhmetova^{*}, I. P. Vokhtancev^{*, **}, M. I. Meschaninova^{*}, M. A. Vorobyeva^{*},
D. O. Zharvov^{*, **}, and D. S. Novopashina^{*, **, #}**

[#] Phone: +7 (383) 363-51-29; e-mail: danov@niboch.nsc.ru

^{*} Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,
prosp. Acad. Lavrentjeva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

^{**} Novosibirsk State University, ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090 Russia

The development of gene editing systems on the base of CRISPR/Cas having higher efficacy, specificity, and possibility of their activity regulation by light irradiation is actually problem. Modification of CRISPR/Cas components, in particular guide RNA, by introduction of photocleavable linkers is the prospective approach for the solution of this problem. We developed the approach for the synthesis of photocleavable guide sgRNA for the CRISPR/Cas9 system containing the linkers on the base of 1-(2-nitrophenyl)-1,2-ethanediol. Such photomodified guide RNAs degrade upon UV-irradiation and CRISPR/Cas9 system is inactivated. We obtained three variants of photomodified sgRNA with different photolinker positions. It was demonstrated that sgRNA variant with photolinker introduced in the Cas9 protein binding and hairpins formation region is able to effectively guide Cas9 nuclease for DNA-target cleavage before UV-irradiation and lose its activity after irradiation. The conditions of controllable 40%-cleavage of model DNA-target were chosen. Developed approach provide specific inactivation of CRISPR/Cas9 gene editing system in specific time moment in definite place. Photoregulation of gene editing system permits not only reduce the undesirable off-target effects, but also becomes the basis of genetic disease therapy.

Keywords: controllable CRISPR/Cas9 system, UV-irradiation, guide sgRNA, photocleavable linker



УДК 577.113.4;577.2.08

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОВЕДЕНИЯ Cy5-ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ В РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ ПО ТИПУ КАТЯЩЕГОСЯ КОЛЬЦА

© 2024 г. С. А. Лапа^{*,#}, П. А. Чиркова^{*}, С. А. Суржиков^{*}, В. Е. Кузнецова^{*},
В. Е. Шершов^{*}, А. В. Чудинов^{*}

** Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32*

Поступила в редакцию 19.11.2023 г.

После доработки 24.11.2023 г.

Принята к публикации 25.11.2023 г.

Синтезированы две пары Cy5-меченных трифосфатов dU и dC с аналогичными электронейтральными структурами флуорофора, различающиеся длиной углеводородного линкера между флуорофором и азотистым основанием. Проведен сравнительный анализ их субстратного поведения в варианте изотермической амплификации ДНК по типу катящегося кольца (RCA) с использованием ДНК-полимеразы Bst 3.0. Установлено, что нуклеотиды с длинным линкером между флуорофором и пириимидиновым основанием эффективнее встраиваются в растущую цепь ДНК, в то время как нуклеотиды с коротким линкером меньше ингибируют RCA. В каждой из пар dU и dC с аналогичными флуорофорами и линкерами большую плотность встраивания демонстрировали флуоресцентно-меченные производные уридина. Установлено, что при одновременном встраивании меченых dU и dC ингибирующий эффект не суммируется. Это дает основания для более внимательного изучения различных вариантов Cy5-dC с целью повышения чувствительности анализа при одновременном введении меченых dU и dC.

Ключевые слова: флуоресцентно-меченные пириимидиновые дезоксинуклеозидтрифосфаты, амплификация по типу катящегося кольца, введение метки в ДНК

DOI: 10.31857/S0132342324040157, **EDN:** MWASES

ВВЕДЕНИЕ

Распространение флуоресцентных меток позволило расширить спектр молекулярно-генетических исследований. Один из наиболее востребованных классов флуорофоров для введения меток в ДНК – цианиновые красители ряда Cy5. В настоящее время широко распространены меченые аналоги дезоксиуридинтрифосфата (Cy5-dU) с различными структурами Cy5-флуорофора

для введения метки непосредственно в процессе ферментативной амплификации. Аналоги дезоксицитидина (Cy5-dC) применяются гораздо реже в силу более сложного синтеза, и поэтому их субстратное поведение недостаточно изучено.

В последние годы уделяется все больше внимания разработке и внедрению методов амплификации нуклеиновых кислот в изотермическом режиме, без использования термоциклера. Предложено несколько разновидностей изотермической ампли-

Сокращения: RCA – амплификация по типу катящегося кольца (от англ. Rolling Circle Amplification); Cy5-dU – цианиновый аналог дезоксиуридина; Cy5-dC – цианиновый аналог дезоксицитидина.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (495) 135-98-00; эл. почта: lapa@biochip.ru).

фикации: метод катящегося кольца (RCA) [1], петлевая изотермическая амплификация (LAMP) [2], рекомбиназная полимеразная реакция (RPA) [3] и некоторые другие [4].

Использование флуоресцентных меток с высокими квантовыми выходами и возможность их введения в ДНК непосредственно в процессе амплификации позволяют повышать чувствительность и надежность диагностических систем.

Целью настоящей работы было определение степени ингибирования RCA и плотности встраивания в растущую цепь ДНК для двух пар трифосфатов дезоксиуридина (dU) и дезоксцитидина (dC), в каждой из которых пиримидиновое основание было модифицировано одним и тем же флуорофором. В качестве генетической мишени для амплификации использовали полногеномную ДНК одного из важных возбудителей пневмонии – золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтезированы четыре пиримидиновых трифосфата дезоксинуклеозидов, содержащие аналогичные флуорофоры по 5-положению азотистого основания и различающиеся длиной линкера между азотистым основанием и флуорофором. Структуры флуорофоров с линкерами приведены на рис. 1. Далее по тексту аналоги dU и dC с коротким линкером обозначены литерой S, с длинным – литерой L. Выбор электронейтрального цвиттерионного флуорофора определялся полученными ранее данными о более эффективной встраиваемости в ПЦР таких нуклеотидов по сравнению с аналогами, несущими положительный или отрицательный суммарный заряд [5, 6]. Общая схема синтеза флуоресцентно-меченных производных Cy5-дезоксипиримидиновых dNTP описана ранее [7, 8].

Проводили реакцию амплификации по типу катящегося кольца (RCA от “Rolling Circle Amplification”) с неполным замещением природных dNTP на флуоресцентно-меченные аналоги. Концентрации Cy5-dNTP выбирали на основании данных по ингибированию ПЦР и PEX (Primer Extension Reaction, реакция удлинения праймера) [9]. Для проведения RCA конструировали так называемый “кольцевой олигонуклеотид” длиной 90 нт, специфичный к участку гена *ebpS* *S. aureus*. Для образования кольца использовали

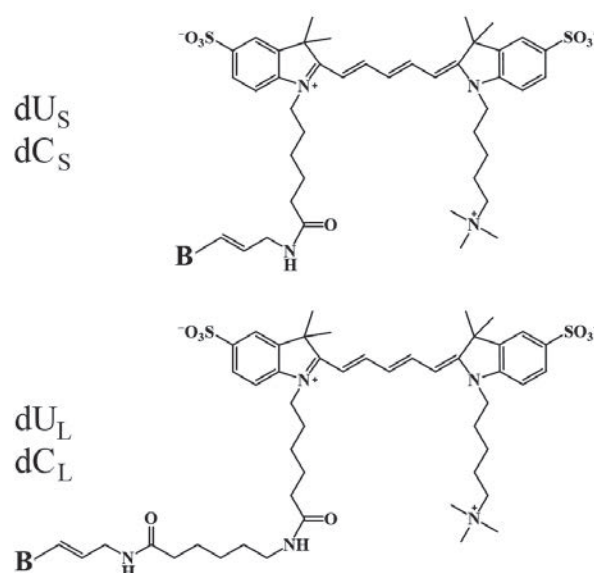


Рис. 1. Флуорофор и линкер, связывающий его с 5-положением азотистого основания. В – азотистое основание. Остальные пояснения приведены в тексте.

геномную ДНК *S. aureus* и лигазу T4. Образовавшийся в результате лигирования кольцевой олигонуклеотид (90 нт) использовали в дальнейших исследованиях в качестве матрицы для амплификации.

На рис. 2а показано накопление флуоресцентного сигнала в процессе проведения RCA в режиме реального времени (на примере dU_L и dC_L). Видно, что при одновременном введении в реакцию обоих модифицированных трифосфатов дезоксинуклеозидов скорость накопления продукта имеет промежуточное значение по сравнению с индивидуальным введением в реакцию dU_L и dC_L (при одинаковой суммарной концентрации). Эта же зависимость характерна для dU_S и dC_S. Для измерения скорости накопления продукта использовали параметр “эффективность амплификации” E_t , позволяющий оценить степень ингибирования RCA. E_t рассчитывали аналогично тому, как описано нами ранее [5], но относили к времени проведения реакции, а не к количеству циклов, как в ПЦР (поэтому данный параметр не может быть сравнен напрямую с эффективностью E в ПЦР). Большее значение показателя E_t соответствует большей скорости накопления продукта (табл. 1).

Для визуального контроля реакции использовали горизонтальный электрофорез с двухволновой (двухканальной) системой детекции. На рис. 2б

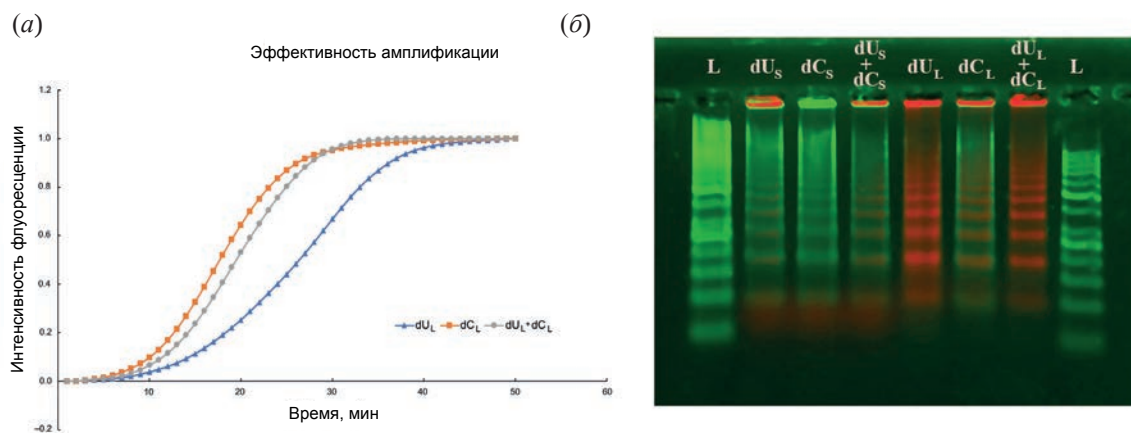


Рис. 2. (а) – Кинетика амплификации RCA на примере dU_L и dC_L как при индивидуальном, так и при совместном применении; (б) – электрофореграмма результатов RCA в двухканальном режиме возбуждения/детекции (“зеленый” канал 530/585 нм и “красный” канал 630/690 нм). L – маркер длин двухцепочечной ДНК GeneRuler 50 bp (Thermo, Латвия).

приведена электрофореграмма в двухволновом режиме, позволяющая визуализировать как суммарный продукт реакции, т.е. ДНК (“зеленый” канал, окрашивание SYBR Green), так и плотность встраивания метки (“красный” канал, флуоресценция Cy5 от встроившихся меченых нуклеотидов). Видно, что увеличение длины линкера способствовало увеличению плотности встраивания, при этом независимо от длины линкера в каждой паре (dU и dC) более высокую плотность встраивания показывали dU по сравнению с dC.

Проводили очистку продуктов реакции на микролонках с мембранами на основе диоксида кремния для последующего измерения плотности встраивания метки спектрофотометрическим методом. Это позволило полностью удалить непрореагировавшие флуоресцентно-меченные трифосфаты и тем самым гарантировать получение

сигнала только от меток, которые встроились в цепи ДНК в процессе их роста. В качестве коэффициента встраивания “K” использовали отношение поглощения образца на длине волны 647 нм (метка) к поглощению на 260 нм (ДНК). Выход продукта рассчитывали по измеренной оптической плотности очищенного продукта амплификации при длине волны 260 нм.

Таким образом, были получены результаты измерения кинетического показателя реакции (E_t – эффективность амплификации, позволяющая оценить степень ингибирования реакции при использовании модифицированных dNTP), выход продукта и плотность встраивания метки в ДНК. Реакцию амплификации и соответствующие измерения для каждого Cy5-dNTP проводили в трех повторностях, находили средние значения. Результаты измерений приведены в табл. 1.

Таблица 1. Показатели субстратной эффективности Cy5-меченных dU и dC

Тип dNTP (концентрация, мкМ)	Выход продукта, мкг	E_t	K
dU_S (32)	21.3	1.14	0.07
dC_S (32)	19.7	1.17	0.03
dU_S (16) + dC_S (16)	15.8	1.15	0.11
dU_L (32)	13.1	1.09	0.19
dC_L (32)	22.5	1.14	0.06
dU_L (16) + dC_L (16)	17.6	1.13	0.22

Примечание: E_t – эффективность амплификации, отнесенная к времени проведения реакции; K – коэффициент встраивания метки (пояснения в тексте).

Обнаружено, что в каждой паре dU и dC с аналогичной модификацией большую плотность встраивания показывает меченое производное dU. В то же время при использовании одновременного встраивания dU и dC при суммарной концентрации, которая была эквивалентна индивидуальной (как при использовании каждого трифосфата по отдельности), плотность встраивания увеличивалась. Это может говорить об отсутствии эффекта “суммарной концентрации” при ингибировании реакции и позволяет при меньших индивидуальных концентрациях Cu5-меченных dU и dC (при использовании их в паре) получать сравнимую или большую плотность встраивания (при уменьшенном за счет уменьшения индивидуальных концентраций ингибирующем эффекте).

Удлинение линкера увеличивало способность полимеразы воспринимать модифицированные нуклеотиды в качестве субстрата, что позволило получить большую плотность встраивания метки на одну молекулу ДНК.

Полученные данные по влиянию длины линкера в RCA соответствуют таковым для ПЦР [5, 10]. Использование одновременного встраивания разноименных Cu5-нуклеотидов способствует увеличению плотности встраивания метки и может быть полезно при анализе мишеней различного GC-состава, увеличивая чувствительность анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы. Образцы геномной ДНК *S. aureus* были выделены и деконтаминированы на базе ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболensk, Россия), как описано ранее [10]. В работе использовали ДНК *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Праймеры и другие олигонуклеотиды. Множественное выравнивание последовательностей гена *ebpS* *S. aureus* проводили с помощью алгоритма ClustalW (www.clustal.org). Конструирование праймеров осуществляли с использованием сетевого ресурса www.idtdna.com, анализ специфичности праймеров проводили с помощью алгоритма BLAST (NIH, США). Для образования (в последующем процессе амплификации) кольцевого видоспецифичного олигонуклеотида синтезировали линейный олигонуклеотид длиной 90 нт, фосфорилированный по 5'-концу, представленный следующей последовательностью: 5'-Ph-TTAGA-

GGCATGTGGTTATGCTAGCAACAGATAGACA-AGATGGAATGCAGATGACGATAGACGATAC-STGCCATCGTTTTGGCTTGCATTA-3', где Ph – фосфат. Для амплификации по типу катящегося кольца использовали два праймера: прямой 5'-CGATAGACGATACCTGCCATCG-3' и обратный 5'-ATCGTCATCTGCATTCCATC-3'. Твердофазный синтез олигонуклеотидов осуществляли с помощью автоматического синтезатора ABI 394 DNA/RNA (Applied Biosystems, США) по стандартному регламенту, очистку производили на колонке BDS Hypersil C18 (Thermo, США).

RCA в режиме реального времени. Реакционная смесь содержала природные dNTP в концентрации 0.2 мМ каждого, а также меченые dNTP в концентрации 32 мкМ при индивидуальном введении в реакцию либо 16 мкМ каждого при совместном введении, 1.5 ед. Bst 3.0 ДНК-полимеразы и соответствующий реакционный буфер (NEB, США), кольцевой олигонуклеотид и праймеры в количестве 5 пмоль на реакционный объем, 10^4 копий на реакционный объем (20 мкл) геномной ДНК *Staphylococcus aureus*, а также необходимое количество 20× EvaGreen (Biotium, США). Смешивание компонентов производили на льду для предотвращения преждевременной амплификации. Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе Gentier 96E (Tianlong, Китай) в режиме реального времени по следующей программе: 50 мин при 65°C при съемке сигнала флуоресценции 1 раз в минуту, далее режим хранения (10°C).

Очистка продуктов реакции от праймеров и dNTP. Продукты RCA очищали от праймеров и dNTP с помощью набора GeneGET Purification Kit (Thermo, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для очистки использовали продукты RCA, полученные из трех реакционных объемов (20 мкл × 3) для каждого флуоресцентно-меченного dNTP, которые смывали с колонки GeneGET с помощью 10 мкл воды Milli-Q. Отсутствие в очищенном растворе ДНК меченых dNTP контролировали электрофоретически при возбуждении флуоресценции при длине волны 630 нм (необходимое условие для последующего измерения флуоресценции только от меток, встроившихся в растущую цепь ДНК).

Электрофорез в агарозном геле. Продукты RCA разделяли в 4%-ном агарозном геле (Agarose

LE, Helicon, Россия) в течение 20 мин при 10 В/см, для окрашивания использовали SYBR Green I (Molecular Probes, США). Визуализацию проводили с помощью системы гель-документирования ChemiScope 6200 Touch (Clinx Science Instruments, КНР) с помощью встроенных LED-светодиодов и светофильтров Green light excitation/emission (для общей детекции ДНК по окрашиванию SYBR Green I) и с помощью встроенных LED-светодиодов и светофильтров Red light excitation/emission, соответствующих характеристикам флуоресцентного красителя Cy5 (для избирательной детекции встроившихся флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов).

Спектрофотометрия. Измерения оптического поглощения проводили на спектрофотометре NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия) при длинах волн 260 и 647 нм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе синтезированы две пары Cy5-модифицированных dU и dC, которые различались между собой длиной линкера между азотистым основанием и флуорофором. Определены степень ингибирования RCA и плотность встраивания в растущую цепь ДНК для каждого из меченых dNTP с использованием в качестве матрицы полногеномной ДНК *S. aureus*. Показана возможность использования меньших индивидуальных концентраций меченых трифосфатов при их одновременном введении в RCA, что позволяет снизить ингибирующий эффект, но получать большую плотность встраивания флуорофора в растущую цепь ДНК. Подтверждено для RCA ранее обнаруженное в ПЦР влияние длины спейсера на субстратные свойства флуоресцентно-меченных dNTP. Наибольшую плотность встраивания удалось получить при совместном введении в реакцию производных dU и dC с длинным линкером между флуорофором и азотистым основанием.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00257).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ali M.M., Li F., Zhang Z., Zhang K., Kang D.K., Ankrum J.A., Le X.C., Zhao W. // Chem. Soc. Rev. 2014. V. 43. P. 3324–3341. <https://doi.org/10.1039/c3cs60439j>
2. Mori Y., Notomi T. // J. Infect. Chemother. 2009. V. 15. P. 62–69. <https://doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>
3. Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L., Armes N.A. // PLoS Biol. 2006. V. 4. P. e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>
4. Чемисова О.С., Цырулина О.А., Трухачев А.Л., Носков А.К. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022. Т. 99. С. 126–138. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-176>
5. Lapa S.A., Volkova O.S., Spitsyn M.A., Shershov V.E., Kuznetsova V.E., Guseinov T.O., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 263–272. <https://doi.org/10.1134/S0132342319040043>
6. Lapa S.A., Guseinov T.O., Pavlov A.S., Shershov V.E., Kuznetsova V.E., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 557–562. <https://doi.org/10.31857/S0132342320040168>
7. Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Emelyanova M.A., Guseinov T.O., Lapa S.A., Nasedkina T.V., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // Dyes Pigments. 2017. V. 147. P. 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.07.052>
8. Shershov V.E., Lapa S.A., Levashova A.I., Shishkin I.Yu., Shtylev G.F., Shekalova E.Yu., Vasiliskov V.A., Zasedatelev A.S., Kuznetsova V.E., Chudinov A.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2023. V. 49. P. 1151–1158. <https://doi.org/10.1134/S1068162023050242>
9. Lapa S.A., Volkova O.S., Kuznetsova V.E., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // Mol. Biol. 2022. V. 56. P. 115–123. <https://doi.org/10.31857/S0026898422010050>
10. Lapa S.A., Miftakhov R.A., Klochikhina E.S., Ammur Y.I., Blagodatskikh S.A., Shershov V.E., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // Mol. Biol. 2021. V. 55. P. 828–838. <https://doi.org/10.1134/S0026893321040063>

Comparative Behavior Analysis of Cy5-Pyrimidine Nucleotides in the Rolling Circle Amplification

S. A. Lapa^{*,#}, P. A. Chirkova^{*}, S. A. Surzhikov^{*}, V. E. Kuznetsova^{*},
V. E. Shershov^{*}, and A. V. Chudinov^{*}

[#] Phone: +7 (495) 135-98-00; e-mail: lapa@biochip.ru

^{*} Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

Two pairs of Cy-5-labeled dU and dC triphosphates with similar electroneutral fluorophore structures differing in the length of the hydrocarbon linker between the fluorophore and the nitrogenous base were synthesized. A comparative analysis of their substrate behavior in the rolling circle amplification (RCA) using Bst 3.0 DNA polymerase was carried out. It was found that nucleotides with a long linker between the fluorophore and pyrimidine base are more efficiently incorporated into the growing DNA chain, while nucleotides with a short linker inhibit RCA less. In each of the dU and dC pairs with similar fluorophores and linkers, fluorescently labeled uridine derivatives demonstrated a high embedding density. It was found that with simultaneous incorporation of labeled dU and dC, the inhibitory effect does not summarise. This gives grounds for a more careful study of various Cy5-dC variants in order to increase a sensitivity of the analysis with simultaneous introduction of labeled dU and dC.

Keywords: fluorescently labeled pyrimidine deoxynucleoside triphosphates, rolling circle amplification, DNA labeling