

ISSN 0132-3423

Том 49, Номер 3

Май - Июнь 2023



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 49, номер 3, 2023

Статьи журнала по соглашению авторов с компанией Pleiades Publishing, Ltd. публикуются на английском языке в журнале "Russian Journal of Bioorganic Chemistry" ISSN 1068-1620, ©Pleiades Publishing, Ltd.

Предисловие к специальным номерам журнала, посвященным памяти академика РАН Вадима Тихоновича Иванова	223
От пептидов к рецепторам (обзорная статья)	
В. И. Цетлин	224
Эволюция биофармацевтики пептидных препаратов (обзорная статья)	
В. Т. Иванов, В. И. Дейгин	229
Терапевтический потенциал и перспективы применения антимикробных пептидов в эпоху глобального распространения антибиотикорезистентности (обзорная статья)	
В. Н. Сафронова, И. А. Болосов, П. В. Пантелеев, С. В. Баландин, Т. В. Овчинникова	243
Многофункциональные белки и их роль в жизнедеятельности клеток (обзорная статья)	
Д. А. Коршунов, Е. Е. Середа, И. В. Кондакова	259
Анализ времен жизни флуоресценции модельных соединений как подход к фотофизической инженерии флуоресцентных белков	
Н. С. Балеева, М. С. Баранов, А. М. Богданов	275
Пространственная структура комплекса Fab-фрагмента моноклонального антитела LNKВ-2 с антигенным нонапептидом интерлейкина-2 человека	
Е. А. Горячева, И. В. Артемьев, Н. В. Плетнева, В. З. Плетнев	285
Удобный метод получения <i>трет</i> -бутиловых эфиров N_{α} -защищенных аминокислот из <i>трет</i> -бутанола	
В. Н. Азев, А. Н. Чулин, М. В. Молчанов, А. И. Мирошников	291
Новый пептид из яда мадагаскарской кошачьеглазой змеи <i>Madagascarophis colubrinus</i> блокирует никотиновый холинорецептор	
Е. В. Крюкова, Д. А. Иванов, Н. В. Копылова, В. Г. Старков, Т. В. Андреева, И. А. Иванов, В. И. Цетлин, Ю. Н. Уткин	296
Особенности комплексов самоорганизующихся пептидов H-(RADA) ₄ -OH со слоями в <i>sup</i> -и <i>anti</i> -ориентации	
А. В. Данилкович, Д. А. Тихонов, В. М. Липкин	306
Разработка системы биосинтеза, выделения и очистки холоформы рекомбинантного нейроглобина и его физико-химическая характеристика	
М. А. Семенова, Ж. В. Бочкова, О. М. Смирнова, А. А. Игнатова, Е. Ю. Паршина, Р. Х. Зиганшин, Э. В. Бочаров, Н. А. Браже, Г. В. Максимов, М. П. Кирпичников, Д. А. Долгих, Р. В. Черткова	319



ПРЕДИСЛОВИЕ К СПЕЦИАЛЬНЫМ НОМЕРАМ ЖУРНАЛА, ПОСВЯЩЕННЫМ ПАМЯТИ АКАДЕМИКА РАН ВАДИМА ТИХОНОВИЧА ИВАНОВА

DOI: 10.31857/S013234232303017X, EDN: PJBAWS



18 сентября 2022 года многолетнему главному редактору журнала “Биоорганическая химия” академику В.Т. Иванову исполнилось бы 85 лет. Он ушел из жизни внезапно в апреле 2022 года.

Вся жизнь Вадима Тихоновича была связана с биоорганической химией. С 1988 по 2017 годы он был бессменным директором Института биоорганической химии, носящего имени его учителей — академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. С 1988 года до самого последнего дня своей жизни он оставался заведующим кафедрой биоорганической химии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и главным редактором журнала “Биоорганическая химия”. Выдающийся ученый, лауреат Ленинской и Государствен-

ной премий, премий Правительства РФ, академик Вадим Тихонович Иванов внес значительный вклад в развитие пептидной химии и пептидомии в нашей стране. Его работы, связанные с установлением структуры пептидов, их химическим синтезом, исследованием взаимосвязи между их структурой и функцией белково-пептидных веществ, выяснением молекулярного механизма их действия, созданием лекарственных препаратов на основе пептидов, широко известны специалистам в области химии пептидов во всем мире.

Редколлегия журнала “Биоорганическая химия” подготовила специальные тематические номера, посвященные памяти академика В.Т. Иванова. В центре внимания в этих специальных номерах журнала прежде всего находятся вопросы теоретической и прикладной пептидной химии, интерес к которой заметно вырос в последнее время, поэтому не случайно в данные номера вошли, в первую очередь, статьи авторов, представляющих научные достижения в этой области биоорганической химии. Среди авторов данных номеров наряду с признанными учеными, своеобразными “старожилами” исследований белково-пептидных веществ, есть и молодые исследователи, коллеги и ученики Вадима Тихоновича.

Академик В.Т. Иванов почти 30 лет был председателем Ученого и Диссертационного советов Института биоорганической химии. На этом посту он проявил себя как широко эрудированный и всесторонне образованный ученый, показавший неподдельный интерес к научным исследованиям своих коллег. Неудивительно, что объявление редколлегии журнала о формировании специальных номеров вызвало научный интерес у широкого круга исследователей. Редколлегия журнала “Биоорганическая химия” выражает искреннюю благодарность всем, кто прислал свои статьи в специальные номера, посвященные памяти академика В.Т. Иванова.

*Главный редактор журнала
“Биоорганическая химия”
академик РАН С.Н. Кочетков*



УДК 577.112.6

ОТ ПЕПТИДОВ К РЕЦЕПТОРАМ¹

© 2023 г. В. И. Цетлин*, #

*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 27.11.2022 г.

После доработки 05.12.2022 г.

Принята к публикации 09.12.2022 г.

В 1960–1970-х гг. в Институте химии природных соединений разрабатывался топохимический подход для конструирования новых биологически активных пептидных соединений, применимость которого к созданию ингибиторов и эффективных субстратов протеолитических ферментов автор этого обзора показал под непосредственным руководством В.Т. Иванова. Следующей задачей было установление конформации белковых нейротоксинов из ядов змей и изучение топографии их связывания с мишенью — никотиновым ацетилхолиновым рецептором (НАХР) из электрического органа ската *Torpedo marmorata*. С помощью селективно меченых производных нейротоксинов, содержащих на установленных аминокислотных остатках по одной флуоресцентной или спиновой метке, впервые были идентифицированы остатки нейротоксина, контактирующие с НАХР. Позднее в сотрудничестве с лабораторией В.Т. Иванова были синтезированы новые аналоги α -конотоксинов (пептидных нейротоксинов из ядовитых моллюсков *Conus*), включая их фотоактивируемые производные, с помощью которых было показано участие всех субъединиц НАХР *Torpedo* в связывании α -конотоксинов. В заключительной части обзора кратко представлены недавние достижения отдела молекулярной нейроиммунной сигнализации (руководитель В.И. Цетлин), касающиеся выделения и синтеза новых пептидных и белковых нейротоксинов и исследования механизма их действия.

Ключевые слова: пептиды, нейротоксины, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, α -конотоксины

DOI: 10.31857/S0132342323030235, **EDN:** PECUIO

ВВЕДЕНИЕ

В Институте химии природных соединений (в настоящее время — ФГБУН “Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН) при участии Вадима Тихоновича Иванова в 1960–1970-х гг. разрабатывался топохимический подход, позволявший направленно создавать новые структурные типы биологически активных молекул. В этом подходе применялось обращение направления ацилирования, замена сложноэфирных и амидных связей, изменение конфигурации асимметрических центров. Возможности разработанного подхода были ярко продемонстрированы при установлении химической и пространственной структуры таких антибиотиков, как валиномицин и энниатин, а также при изучении осуществляемого ими транспорта ионов через биологические мембраны. Эти работы получили широкое признание в мире, о чем свидетельствовала их презентация на международных конгрессах и публикации в пре-

стижных высокорейтинговых журналах (см., например, [1]). В рамках выполнения кандидатской диссертации В.И. Цетлина была проведена проверка применимости этого подхода к созданию эффективных ингибиторов и субстратов протеолитических ферментов. Затем в лаборатории В.Т. Иванова была выполнена работа с природными белковыми нейротоксинами: анализ пространственной структуры, разработка методов селективной модификации и изучение взаимодействия токсинов с их мишенью — никотиновым ацетилхолиновым рецептором (НАХР). Следующим этапом был анализ взаимодействия НАХР с α -конотоксинами, проводившийся в лаборатории рецепции нейропептидов (возглавляемой автором этого обзора) в сотрудничестве с лабораторией химии пептидов В.Т. Иванова.

Установлено, что изменение конфигурации отдельных аминокислотных остатков в линейных пептидах отражается на эффективности их взаимодействия с протеолитическими ферментами химо tripsином и пепсином [2]. Наиболее интересные результаты были получены для циклопептидов: ранее считалось, что пептидные связи в циклических пептидах недоступны для расщепления протеолитическими ферментами, и циклопептиды могут играть роль только ингибиторов,

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: АХСБ — ацетилхолин-связывающий белок; НАХР — никотиновый ацетилхолиновый рецептор.

Автор для связи: (эл. почта: victortsetlin3f@gmail.com).

однако в нашей работе была синтезирована серия циклических пептидов, содержащих чувствительный к действию пепсина и химотрипсина фрагмент Leu-Tyr, но различающихся по числу входящих в состав пептида остатков Gly (4–8). В результате было установлено, что гекса- и октапептиды – ингибиторы, тогда как циклодекапептид оказался субстратом, превосходящим по эффективности имевшиеся тогда линейные субстраты этих ферментов [3]. Современные методы компьютерного моделирования позволяют конструировать лиганды с желаемыми структурой и функциональными свойствами на основании баз данных ЯМР и рентгеноструктурного анализа о пространственных структурах пептидных и белковых соединений, а также об их комплексах с ферментами, рецепторами и иными мишенями. Однако следует отметить, что синтез пептидных аналогов с ретро- и ретро-энантиостроением и их циклизация продолжают применяться, например, для получения пептидов, устойчивых к протеолизу, а также для пептидов, используемых для внутриклеточной доставки разнообразных прикрепленных к ним соединений [4]. Этот же подход был применен для синтеза пептида, устойчивого к протеолизу, взаимодействующего с рецептором трансферрина и способного проникать через гематоэнцефалический барьер [5]. Ретро-энантио-пептиды рассматриваются и как перспективные соединения-кандидаты для предупреждения проникновения вируса HIV-1 (вирус иммунодефицита человека 1-го типа) [6]. Поскольку ниже пойдет речь о нейротоксинах из яда змей, уместно отметить недавнюю работу, в которой ретро-энантио-пептидные фрагменты кроталицидина из яда гремучей змеи рассматриваются как возможные антимикробные средства [7].

Следующим этапом работы под руководством В.Т. Иванова было исследование конформации природных белковых нейротоксинов змей и изучение топографии их связывания с мишенью – нАХР. Работы в ИБХ РАН по токсинной тематике были инициированы академиком Ю.А. Овчинниковым. В лаборатории В.Т. Иванова была синтезирована серия избирательно меченых производных нейротоксинов змей, и в сотрудничестве с лабораторией, руководимой В.Ф. Быстровым, методом ¹H-ЯМР была получена первая информация о пространственном строении нейротоксина, в частности установлена сближенность петель II и III нейротоксина [8]. В те годы полная структура такого белка не могла быть установлена методом ¹H-ЯМР, но годом позже полная пространственная структура родственного нейротоксина была определена методом рентгеноструктурного анализа [9], в ней было детально охарактеризовано расположение трех петель нейротоксина (из-за чего позднее появилось название этих нейротоксинов как “трехпетельных”); с кристаллической структурой согласовывался и сделанный нами вывод.

В лаборатории В.Т. Иванова были проведены исследования природных α -нейротоксинов и их химически модифицированных производных различными спектральными методами [10]. Принципиальное значение имело выполненное нами впервые восстановление природного α -нейротоксина длинного типа и разработанные условия его последующего реокисления с полным восстановлением исходной токсичности [11].

Важной задачей выступило получение информации о том, какими участками нейротоксин контактирует с его мишенью – нАХР. Для этого в лаборатории В.Т. Иванова с помощью избирательной химической модификации была получена серия производных, содержащих по одной спиновой или флуоресцентной метке на идентифицированных остатках α -нейротоксина II из яда среднеазиатской кобры *Naja oxiana*. Привлечение шведского ученого Эверта Карлссона, впервые очистившего рецептор нАХР из электрического ската *Torpedo marmorata* аффинной хроматографией на колонке со змеиным токсином, предоставило нам этот рецептор и позволило методами флуоресценции и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в сотрудничестве с лабораторией В.Ф. Быстрова впервые идентифицировать ряд аминокислотных остатков нейротоксина, контактирующих с рецептором [12]. Следует отметить, что тогда информация о пространственном строении самого рецептора отсутствовала.

В настоящее время имеются данные рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии для нАХР мышечного типа из электрического органа ската *Torpedo* и для некоторых нАХР нейронального типа. Кристаллические структуры комплексов α -нейротоксинов с такими моделями, как ацетилхолин-связывающий белок (АХСБ), который имитирует лиганд-связывающий домен нАХР, а также с гетерологически экспрессированными лиганд-связывающими доменами $\alpha 1$ - и $\alpha 9$ -субъединиц нАХР ранее были сделаны с α -бунгаротоксином, нейротоксином длинного типа; с этим же токсином позднее были решены комплексы с полноразмерными *Torpedo* и $\alpha 7$ нАХР. Рассмотренное выше изучение топографии связывания было выполнено нами на нейротоксине короткого типа – представленные токсины несколько отличаются от нейротоксинов длинного типа по избирательности связывания с различными типами никотиновых рецепторов. Однако совсем недавно была установлена криоэлектронная структура рецептора *Torpedo* в комплексе с нейротоксином короткого типа [13]. Как и в случае с α -бунгаротоксином, главную роль в связывании играет центральная петля II нейротоксина. Однако в установленных ранее структурах боковая петля III α -бунгаротоксина не контактировала с рецептором, но в случае короткого нейротоксина она существенна для взаимодействия. Заключение о роли этой петли было

сделано нами в ранних работах, что отмечено и авторами цитируемой работы [13].

В дополнение к флуоресцентным и спин-меченым производным позднее в лаборатории рецепции нейропептидов (руководитель В.И. Цетлин) были получены разнообразные фотоактивируемые производные нейротоксинов короткого и длинного типов. При этом было установлено участие в связывании α -нейротоксинов не только α -субъединиц рецептора *Torpedo*, но и других его субъединиц, а в сотрудничестве с профессором Ф. Хухе (Свободный университет, Берлин) была идентифицирована одна из точек контакта в самом рецепторе [14].

Наш интерес к ядам животных не ограничивался только их белковыми компонентами. Так, в яде пчелы присутствует пептид апамин, мишенью действия которого служат Ca^{2+} -активируемые K^{+} -каналы. В лаборатории В.Т. Иванова разрабатывались различные варианты синтеза биологически активных пептидов и впервые были получены радиоактивные производные этого пептида [15].

В современных исследованиях никотиновых рецепторов важную роль играют α -конотоксины — нейротоксические пептиды из ядовитых морских моллюсков *Conus*. Они не только позволяют различить мышечные и нейрональные подтипы nAChR, но и служат прекрасными идентификаторами индивидуальных подтипов нейрональных nAChR. В сотрудничестве с лабораторией В.Т. Иванова была синтезирована серия различных α -конотоксинов [16], получены их фотоактивируемые производные, и для последних установлены фотоиндуцируемые контакты со всеми субъединицами рецептора *Torpedo* [17]. Важным достижением стало первое установление кристаллической структуры α -конотоксина в комплексе с ацетилхолин-связывающим белком [18], выполненное в совместном исследовании с голландскими учеными, открывшими этот белок, выступающий прекрасной структурной моделью лиганд-связывающих доменов не только nAChR, но и остальных рецепторов семейства лиганд-управляемых каналов.

Следует упомянуть еще один пример сотрудничества с лабораторией В.Т. Иванова — речь идет о бактериородопсине, рецепторе света и протонном канале. Мы впервые применили метод тритиевой планиграфии к мембранному белку, что позволило по уровню включенной радиоактивности отличить участки полипептидной цепи, находящиеся на поверхности, от участков, расположенных внутри мембраны [19].

Работы по токсинной тематике, начатые в лаборатории химии пептидов, руководимой В.Т. Ивановым, достаточно успешно продолжают и в настоящее время в отделе молекулярной нейроиммунной сигнализации (руководитель В.И. Цетлин), в сотрудничестве главным образом с другими отделами нашего института, а также с зарубежными лабораториями. Протеом-

ные и транскриптомные исследования выполняются в лаборатории молекулярной токсикологии (руководитель проф. Ю.Н. Уткин): так, недавно в яде многополосного крайта *Bungarus multicinctus* были обнаружены новые аналоги α -бунгаротоксина, которые, в отличие от него, способны различать два ортостерических центра в nAChR *Torpedo californica* [20]. Были проведены детальные исследования ядов ряда гадюк (в том числе обитающих в России) и, в частности, охарактеризованы находящиеся в них различные фосфолипазы A2 [21]. Недавно в совместной работе с ФГБУ “Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи” было установлено, что некоторые димерные фосфолипазы A2 из яда гадюк проявляют вирулицидную активность, препятствуя взаимодействию рецептор-связывающего домена S-белка вируса SARS-CoV-2 с клеточным рецептором ACE2 и разрушая липидный бислой вируса [22].

В лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий (руководитель д.х.н. И.Е. Кашеверов) проводится анализ взаимодействия α -конотоксинов с различными подтипами нейрональных nAChR, выступающими мишенями для поиска лекарств против нейродегенеративных заболеваний. С использованием нового метода компьютерного моделирования, разработанного проф. Р.Г. Ефремовым с сотр., были предложены, а затем синтезированы новые аналоги α -конотоксинов, значительно превышающие природные соединения по сродству к $\alpha 7$ нейрональному nAChR [23], играющему важную роль в регулировании воспалительных процессов.

Совместно с китайскими учеными И.Е. Кашеверов и сотр. анализировали кристаллические структуры АХСБ с теми α -конотоксинами, которые имеют различное сродство к определенным подтипам нейрональных nAChR. Так, для α -конотоксина LvIA был выполнен рентгеноструктурный анализ комплекса с АХСБ, затем аланиновое сканирование α -конотоксина и установлены кристаллические структуры выбранных аналогов в комплексе с АХСБ. Затем проведено компьютерное моделирование комплекса уже с $\alpha 3\beta$ nAChR, мутагенез $\beta 2$ -субъединицы, и с помощью электрофизиологического метода оценена эффективность ингибирования — в итоге впервые идентифицированы контакты $\beta 2$ -субъединицы с токсином, ответственные за его специфичность именно к данному подтипу рецептора [24].

В проводившихся под руководством академика В.Т. Иванова работах пептиды использовались не только в качестве удобных инструментов в самых разнообразных фундаментальных исследованиях, но и для разработки возможных лекарственных средств, что прекрасно иллюстрируется созданием на основе глюкозаминилмурамилди-пептида (GMDP) [25] широко используемого иммуностимулирующего препарата ликопада. В совместной работе с академиком В.Т. Ивано-

вым была проверена возможность использования пептидных фрагментов α -субъединицы нАХР как возможных лекарственных соединений для лечения нейродегенеративных заболеваний [26].

Пептидные и белковые нейротоксины из ядов животных не только служат прекрасными инструментами для выяснения роли соответствующих рецепторов в физиологических и патофизиологических процессах, но и открывают пути к созданию новых лекарств. Здесь следует упомянуть капотен (каптоприл), который представляет собой модифицированный остаток пролина. Этот препарат был создан более 30 лет назад на основе пептида из яда бразильской змеи *Bothrops jaraca*, ингибирующего ангиотензин-превращающий фермент (АСЕ) и понижающего кровяное давление. В настоящее время имеются данные о том, что модифицированные производные природного α -конотоксина RgIA, мишенью которого выступают $\alpha 9/\alpha 10$ нАХР, проходят испытания как средства против нейропатической боли [27]. С учетом значительного числа и важной роли остатков аргинина в α -конотоксинах нами были проанализированы олигоаргинины различной длины (известные средства для внутриклеточной доставки различных присоединяемых к ним соединений) и установлено, что олигоаргинины представляют собой новый класс ингибиторов нАХР [28]. В недавней нашей работе [29] было показано, что сходную с α -конотоксином RgIA анальгетическую активность проявляет и октаолигоаргинин R8, эффективный ингибитор $\alpha 9/\alpha 10$ нАХР, синтез которого значительно проще синтеза α -конотоксинов. Другой пример — аземиопсин — линейный пептид из яда гадюки *Azemiops feae*, не имеющий дисульфидных связей, но тем не менее способный ингибировать мышечные нАХР. Проведенные доклинические испытания [30] показали, что по своей миорелаксантной активности аземиопсин превосходит такие использующиеся сейчас соединения, как рокурониум.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный обзор показывает, что исследования пептидов и белков, начатые под руководством академика В.Т. Иванова (когда он был старшим научным сотрудником), выполнялись достаточно успешно, получили международное признание и активно проводятся сейчас на фоне быстро развивающихся нейробиологии и нейробиологии, поддерживаемых современными генно-инженерными и спектральными методами. Работы широко ведутся в ИБХ РАН, в том числе в отделе молекулярной нейроиммунной сигнализации (руководитель В.И. Цетлин, ученик академика В.Т. Иванова). Отметим, что тремя лабораториями в отделе молекулярной нейроиммунной сигнализации руководят проф. Ю.Н. Уткин, д.х.н. И.Е. Кашеверов и д.х.н. И.В. Шелухина, научная

биография которых начиналась в ИБХ РАН и здесь же успешно продолжается.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00769).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shemyakin M.M., Ovchinnikov Yu.A., Ivanov V.T. // *Angew. Chem.* 1969. V. 14. P. 523–529.
2. Цетлин В.И., Шепель Е.Н., Иванов В.Т., Овчинников Ю.А. // *Биохимия.* 1975. Т. 40. С. 347–352.
3. Цетлин В.И., Иванов В.Т., Овчинников Ю.А. // *Биохимия.* 1975. Т. 40. С. 694–697.
4. Lucana M.C., Arruga Y., Petrachi E., Roig A., Lucchi R., Oller-Salvia B. // *Pharmaceutics.* 2021. V. 13. P. 2065. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122065>
5. Prades R., Oller-Salvia B.S., Selva J., Moros M., Balbi M., Grazi V., M de La Fuente J., Plesnila N., Teixidó M., Giralt E. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2015. V. 54. P. 3967–3972. <https://doi.org/10.1002/anie.201411408>
6. Gomara M.J., Perez Y., Gomez-Gutierrez P., Herrera C., Ziprin P., Martinez J.P., Meyerhans A., Perez J.J., Haro I. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 14430. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71404-0>
7. Carrera-Aubert A., Defaus S., Pérez-Peinado C., Sandín D., Torrent M., Jiménez M.Á., Andreu D. // *Biomedicines.* 2022. V. 10. P. 2110. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092110>
8. Arseniev A.S., Balashova T.A., Utkin Yu.N., Tsetlin V.I., Bystrov V.F., Ivanov V.T., Ovchinnikov Yu.A. // *Eur. J. Biochem.* 1976. V. 71. P. 595–606. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb11150.x>
9. Tsernoglou D., Petsko G.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. P. 971–974. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.3.971>
10. Tsetlin V.I., Arseniev A.S., Utkin Yu.N., Gurevich A.Z., Senyavina L.S., Bystrov V.F., Ivanov V.T., Ovchinnikov Yu.A. // *Eur. J. Biochem.* 1979. V. 94. P. 337–346.
11. Уткин Ю.Н., Цетлин В.И., Иванов В.Т. // *Биоорг. химия.* 1979. Т. 5. С. 1033–1044.
12. Tsetlin V.I., Karlsson E., Arseniev A.S., Utkin Yu.N., Surin A.M., Pashkov V.S., Ivanov V.T., Bystrov V.F., Ovchinnikov Yu.A. // *FEBS Lett.* 1979. V. 106. P. 47–52. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)80692-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80692-4)
13. Nys M., Zarkadas E., Brams M., Mehregan A., Kambara K., Kool J., Casewell N.R., Bertrand D., Baenziger J.E., Nury H., Ulens C. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 4543. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32174-7>
14. Machold J., Utkin Yu., Kirsch D., Kaufmann R., Tsetlin V., Hucho F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92.

- P. 7282–7286.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7282>
15. Нуридинов А.Р., Цетлин В.И., Иванов В.Т. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. С. 165–178.
 16. Жмак М.Н., Кашеверов И.Е., Уткин Ю.Н., Цетлин В.И., Вольпина О.М., Иванов В.Т. // Биоорг. химия. 2001. Т. 27. С. 83–88. [Zhmak M.N., Kasheverov I.E., Utkin Yu.N., Tsetlin V.I., Vol'pina O.M., Ivanov V.T. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2001. V. 27. P. 67–71.]
<https://doi.org/10.1023/A:1011319101676>
 17. Kasheverov I., Rozhkova A., Zhmak M., Utkin Yu., Ivanov V., Tsetlin V.I. // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. P. 3664–3673.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02272.x>
 18. Celie P.H.N., Kasheverov I.E., Mordvintsev D.Y., Hogg R.C., van Nierop P., van Elk R., van Rossum-Fikkert S.E., Zhmak M.N., Bertrand D., Tsetlin V., Sixma T.K., Smit A.B. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2005. V. 12. P. 582–588.
<https://doi.org/10.1038/nsmb951>
 19. Tsetlin V.I., Alyonycheva T.N., Shemyakin V.V., Neiman L.A., Ivanov V.T. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 178. P. 123–129.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14437.x>
 20. Utkin Y.N., Kuch U., Kasheverov I.E., Lebedev D.S., Cederlund E., Molles B.E., Polyak I., Ivanov I.A., Prokopen N.A., Ziganshin R.H., Jorvall H., Alvelius G., Chanhom L., Warrell D.A., Mebs D., Bergman T., Tsetlin V.I. // Biochem. J. 2019. V. 476. P. 1285–1302.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20180909>
 21. Babenko V.V., Ziganshin R.H., Weise C., Dyachenko I., Shaykhutdinova E., Murashev A.N., Zhmak M., Starkov V., Hoang A.N., Tsetlin V., Utkin Y. // Biomedicines. 2020. V. 8. P. 249.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8080249>
 22. Siniavin A.E., Streltsova M.A., Nikiforova M.A., Kudryavtsev D.S., Grinkina S.D., Gushchin V.A., Mozhaeva V.A., Starkov V.G., Osipov A.V., Lummis S.C.R., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // Cell. Mol. Life Sci. 2021. V. 78. P. 7777–7794.
<https://doi.org/10.1007/s00018-021-03985-6>
 23. Kasheverov I.E., Chugunov A.O., Kudryavtsev D.S., Ivanov I.A., Zhmak M.N., Shelukhina I.V., Spirova E.N., Tabakmakher V.M., Zelepuga E.A., Efremov R.G., Tsetlin V.I. // Sci. Rep. 2016. V. 14. P. 36848.
<https://doi.org/10.1038/srep36848>
 24. Zhu X., Pan S., Xu M., Zhang L., Yu J., Yu J., Wu Y., Fan Y., Li H., Kasheverov I.E., Kudryavtsev D.S., Tsetlin V.I., Xue Y., Zhangsun D., Wang X., Luo S. // J. Med. Chem. 2020. V. 63. P. 13656–13668.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00975>
 25. Meshcheryakova E.A., Mineev K.S., Volynski P.E., Andronova T.M., Ivanov V.T. // J. Pept. Sci. 2015. V. 9. P. 717–722.
<https://doi.org/10.1002/psc.2796>
 26. Kamynina A.V., Volpina O.M., Medvinskaya N.I., Aleksandrova I.J., Volkova T.D., Koroev D.O., Samokhin A.N., Nesterova I.V., Shelukhina I.V., Kryukova E.V., Tsetlin V.I., Ivanov V.T., Bobkova N.V. // J. Alzheimer's Dis. 2010. V. 21. P. 249–261.
<https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091474>
 27. Hone A.J., McIntosh J.M. // FEBS Lett. 2018. V. 592. P. 1045–1062.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.12884>
 28. Lebedev D.S., Kryukova E.V., Ivanov I.A., Egorova N.S., Timofeev N.D., Spirova E.N., Tufanova E.Y., Siniavin A.E., Kudryavtsev D.S., Kasheverov I.E., Zouridakis M., Katsarava R., Zavrashvili N., Iagorshvili I., Tzartos S.J., Tsetlin V.I. // Mol. Pharmacol. 2019. V. 96. P. 664–673.
<https://doi.org/10.1124/mol.119.117713>
 29. Dyachenko I.A., Palikova Y.A., Palikov V.A., Korolkova Y.V., Kazakov V.A., Egorova N.S., Garifulina A.I., Utkin Y.N., Tsetlin V.I., Kryukova E.V. // Biochimie. 2022. V. 194. P. 127–136.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.12.013>
 30. Shelukhina I.V., Zhmak M.N., Lobanov A.V., Ivanov I.A., Garifulina A.I., Kravchenko I.N., Rasskazova E.A., Salmova M.A., Tikhovskaya E.A., Rykov V.A., Slashcheva G.A., Egorova N.S., Muzyka I.S., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // Toxins (Basel). 2018. V. 10. P. 34.
<https://doi.org/10.3390/toxins10010034>

From Peptides to Receptors

V. I. Tsetlin*, #

#E-mail: victortsetlin3f@gmail.com

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

In the 1960s and 1970s, the Institute of Chemistry of Natural Compounds developed a topochemical approach for designing new biologically active peptide compounds, the applicability of which to the creation of inhibitors and effective substrates of proteolytic enzymes was shown by the author of this review under the direct supervision of V.T. Ivanov. The next task was to establish the conformation of protein neurotoxins from snake venoms and to study the topography of their binding to the target, the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) from the electric organ of the *Torpedo marmorata* ray. With selectively labeled derivatives containing one fluorescent or spin label on established amino acid residues, neurotoxin residues in contact with nAChR were identified for the first time. Later, in collaboration with the laboratory of V.T. Ivanov, new analogues of α -conotoxins (peptide neurotoxins from poisonous mollusks *Conus*), were synthesized including their photoactivated derivatives, which showed the participation of all *Torpedo* nAChR subunits in the binding of α -conotoxins. The final part of the review briefly presents the recent achievements of the Department of Molecular Neuroimmune Signaling (headed by V.I. Tsetlin) concerning the isolation and synthesis of new peptide and protein neurotoxins and the study of their mechanism of action.

Keywords: peptides, neurotoxins, nicotinic acetylcholine receptor, α -conotoxins

ЭВОЛЮЦИЯ БИОФАРМАЦЕВТИКИ ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ¹

© 2023 г. В. Т. Иванов*, В. И. Дейгин*, #

*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 02.11.2022 г.

После доработки 16.11.2022 г.

Принята к публикации 18.11.2022 г.

Пептиды — низкомолекулярные вещества, участвующие в многочисленных физиологических процессах, таких как рост и развитие организма, стресс, регуляция эмоционального состояния, сексуального поведения и иммунных реакций. Большинство пептидов служат лигандами к белкам, взаимодействие с которыми приводит к высокоселективным эффектам. Такие свойства, так же как и низкая токсичность, позволяют считать пептиды потенциальными эффективными лекарствами. Получение пептидных препаратов стало возможным в начале XX века после разработки метода их селективного синтеза. Несмотря на успехи синтеза первых пептидных препаратов, осталось нерешенным множество вопросов, связанных с повышением стабильности, биодоступности, периода полувыведения и способности перемещаться через клеточные мембраны. В обзоре рассмотрен исторический путь развития синтеза и производства пептидов, а также обсуждаются современные подходы к созданию пептидных лекарственных средств и их применение в биофармацевтике, в том числе в разработке оригинальных пептидных препаратов в России.

Ключевые слова: синтез пептидов, биологическая активность, циклопептиды, пептидомиметики

DOI: 10.31857/S0132342323030120, **EDN:** PDQSFV

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	229
РОЛЬ ПЕПТИДОВ В ОРГАНИЗМЕ.....	231
ПРИМЕНЕНИЕ ПЕПТИДОВ В БИОФАРМАЦЕВТИКЕ.....	231
СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	232
ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	234
СТРАТЕГИИ ПОВЫШЕНИЯ ПРОНИ- ЦАЕМОСТИ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ПЕПТИДОВ.....	234
СИНТЕЗ ЦИКЛИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ И ПЕПТИДОМИМЕТИКОВ.....	236
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	239
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	239

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что вещества, состоящие из аминокислот, называют белками — это важнейшие компоненты жизнедеятельности всего живого на Земле. Аминокислоты соединены между собой в цепочки химической амидной связью, называемой пептидной.

Исследования химической структуры и биологических свойств веществ пептидно-белковой природы стали возможны в начале XX века, когда ученым-химикам, в первую очередь Э. Фишеру, удалось разработать методы избирательного синтеза пептидов, состоящих из нескольких аминокислот [1].

В настоящее время в мировой фармацевтической индустрии зарегистрировано >5000 фармацевтических субстанций на основе природных и синтетических органических соединений и только ~80 препаратов из них пептидной природы (65 зарубежных и 14 российских).

Для удобства работы принято условно классифицировать пептиды по размерам пептидной цепи. Все молекулы, состоящие из 50 и более аминокислотных остатков (а.о.), называют белками, а менее длинные последовательности — пептидами. В свою очередь, пептиды тоже подразделяют на полипептиды (20–50 а.о.), олигопептиды (10–

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: ССК — холецистокинин; АКГ — адренокортикотропный гормон; ДКП — 2,5-дикетопиперазин.

Автор для связи: (тел.: +7 (985) 920-71-44; эл. почта: vdeigin8@gmail.com).

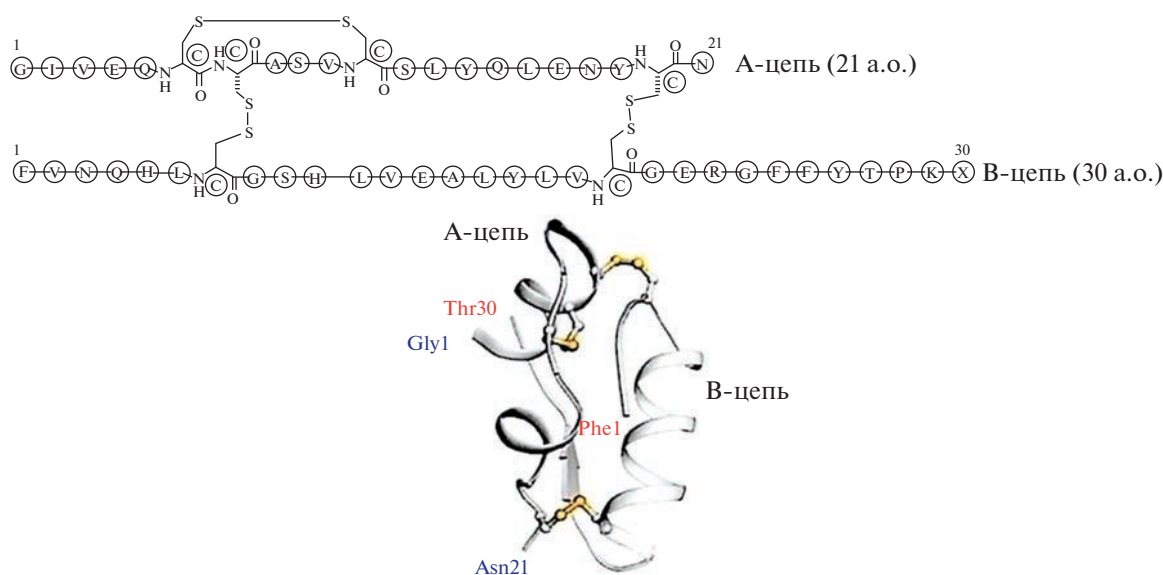


Рис. 1. Аминокислотная последовательность и трехмерная структура инсулина [2].

20 а.о.) и короткие пептиды (мини-пептиды, 2–10 а.о.). Все эти разделения довольно условны, и с развитием методов получения белков и пептидов различия, в первую очередь технологического свойства, постепенно стираются.

В качестве примера на рис. 1 приведены аминокислотная последовательность и трехмерная структура исторически одного из наиболее важных соединений — инсулина (пограничного, по определению, между полипептидами и белками) [2].

РОЛЬ ПЕПТИДОВ В ОРГАНИЗМЕ

Пептиды широко распространены в природе. Пептидный пул присутствует во всех клеточных организмах и представляет собой уникальный класс фармакологических соединений, находящийся между малыми органическими молекулами (small molecules), используемыми в фармацевтике в качестве лекарственных препаратов, и белками, хотя биохимически и терапевтически они отличны от обеих групп [3, 4].

Пептиды — универсальные регуляторы многочисленных процессов, протекающих в живых организмах. Пептиды представляют собой фрагменты белков, образующиеся при их частичном гидролизе. При нарушении пептидэргической регуляторной функции в работе клеток происходит сбой, влекущий за собой расстройство жизнедеятельности и функционирования поврежденного органа и всего организма. Пептиды также регулируют эмоциональные реакции, сон, сексуальное поведение, агрессию, проявляют анальгетические и многие другие свойства [5]. Пептиды отвечают и за стимуляцию или подавление имму-

нитета [6]. Некоторые пептиды также способны выведению из организма радионуклидов и солей тяжелых металлов [7]. Использование пептидов в качестве терапевтических средств эволюционировало в течение времени и продолжает развиваться вместе с появлением новых подходов как к их синтезу, так и к современным методам лечения.

Пептиды — основной пример того, как природа создает из одного гена, кодирующего соответствующий белок, множество регулируемых функциональных пептидов, действующих в организме в нужных местах и в нужное время. Известно, что белки на начальной стадии процессинга гидролизуются сложной системой из более чем 500 протеаз, действующих на внутриклеточные сайты, откуда, после секреции, пептиды транспортируются во внеклеточную среду для выполнения своих функций с последующим регулируемым гидролизом до аминокислот [8].

После завершения работ по расшифровке генома человека, определивших новое направление в науке, названное геномикой, возникло множество новых разнообразных комплексных “омикс-технологий”. Одним из важнейших комплексных направлений, следующим после геномики, на котором ученые сосредоточили свое внимание, стала протеомика, еще более комплексная программа исследования структуры и функции белков в организме. Геномная и протеомная эра стимулировали работы, в результате которых исследователи смогли идентифицировать молекулярные характеристики и структуры рецепторов для многих важных эндогенных пептидов [9, 10].

На базе новой парадигмы стало понятно, что следующим логичным этапом следует ожидать рождение нового раздела биоорганической химии — пептидомики, направленного на исследование процессинга белков и детальное изучение пептидов как продуктов белкового гидролиза. Пептидомика, выросшая из протеомики, обеспеченная современными технологиями, в настоящее время, помимо синтетического направления, занимается всесторонним качественным и количественным анализом пептидов в биологических образцах [11, 12]. Основные задачи пептидомики — всестороннее картирование протеолитических фрагментов белков, идентификация возможных пептидных биомаркеров различных заболеваний, определение пептидных гормонов и других сигнальных молекул. Комплексные биологические системы, обычно исследуемые в пептидомике, требуют систематической экстракции различных типов пептидов для достижения успешного анализа. Методами пептидомики были обнаружены и выделены из различных тканей, клеток и оргanelл животных новые пептидные молекулы и установлены их последовательности с помощью современной методологии секвенирования [13].

Постоянно растущий интерес вызывают биологически активные пептиды, действующие на центральную нервную систему. В центре внимания находятся нейропептиды, в особенности нейромедиаторы, модуляторы нервной активности, эндогенные пептиды опиоидного действия и многие другие [14]. Один из примеров — важный класс эндогенных нейроактивных мессенджеров — нейропептиды [15], они участвуют в регуляции большинства физиологических процессов у животных. Пептидные гормоны первоначально синтезируются на рибосоме в виде препрогомона. Этот предшественник с высокой молекулярной массой содержит *N*-концевой сигнальный пептид, направляющий белок в эндоплазматический ретикулум, где сигнальный пептид отщепляется сигнальной пептидазой. Прогормон обычно не обладает значительной биологической активностью. Большинство прогормонов и про-нейропептидов содержат в своих последовательностях несколько пептидов меньшего размера с различными биологическими активностями. Эти прогормоны обычно подвергаются посттрансляционной обработке — образованию дисульфидных связей или химическим модификациям, таким как *N*-гликозилирование, *O*-гликозилирование, ацетилирование или амидирование. Прогормоны подвергаются дальнейшему специфическому протеолитическому расщеплению, а затем сортируются в секреторные гранулы. Многие гормоны (вазопрессин, пролактин, окситоцин, АКТГ, брадикинин и др.) относятся к пептидам [16].

ПРИМЕНЕНИЕ ПЕПТИДОВ В БИОФАРМАЦЕВТИКЕ

Современная пептидомика и направление пептидной биофармацевтики не отставали от научных инноваций, исследуя новые соединения и молекулярные мишени, используя новые стратегии химии для расширения молекулярного разнообразия, а также путем разработки улучшенных фармацевтических свойств пептидов и пептидомиметиков. Поиск и выделение новых биологически активных пептидов из различных источников, определение спектра их активностей расширяют возможности использования пептидных соединений. Современные технологии позволяют выделять и исследовать в качестве кандидатов потенциальных терапевтических средств пептиды из животных, морских организмов и растений, а также антимикробные пептиды из амфибий и других микроорганизмов [17].

Пептиды представляют уникальную терапевтическую нишу и занимают заметное место в развивающейся биофармацевтике. Они перспективны как инструменты для решения проблем, связанных с усовершенствованием специфики действия лекарств, а также для поиска новых соединений и их аналогов, селективно связывающихся на молекулярном уровне с белковыми мишенями [18]. Изучение биологической активности пептидов в различных моделях и исследование их влияния на физико-химические процессы в организме показало несомненную перспективность дальнейшего использования этих соединений в медицинских целях.

Новым этапом развития медицинской науки и практики стала разработка персонализированной медицины. Потребовался больший акцент на эффективность, безопасность и специфичность действия препаратов и методов диагностики. Основываясь на последних достижениях в области пептидомики, стало возможным определять с помощью пептидов новые биомаркеры на ранних стадиях заболевания [19, 20].

Принимая во внимание положительные терапевтические свойства пептидов, многие разработки лекарств увеличили количество своих потенциальных разработок за счет новых пептидов и пептидомиметиков. Поэтому потенциальный рынок пептидных препаратов стал более интенсивно развиваться, когда, понимая его перспективность, на него обратили внимание разработчики лекарственных средств из глобального фармацевтического сектора [21].

Большинство пептидных препаратов (~85%) получают химическим синтезом, что в значительной степени связано с развитием современных методов пептидного синтеза, и лишь для 15% пептидных лекарств используют рекомбинантные методы. Технологии химического синтеза предоставляют большие возможности для модифика-

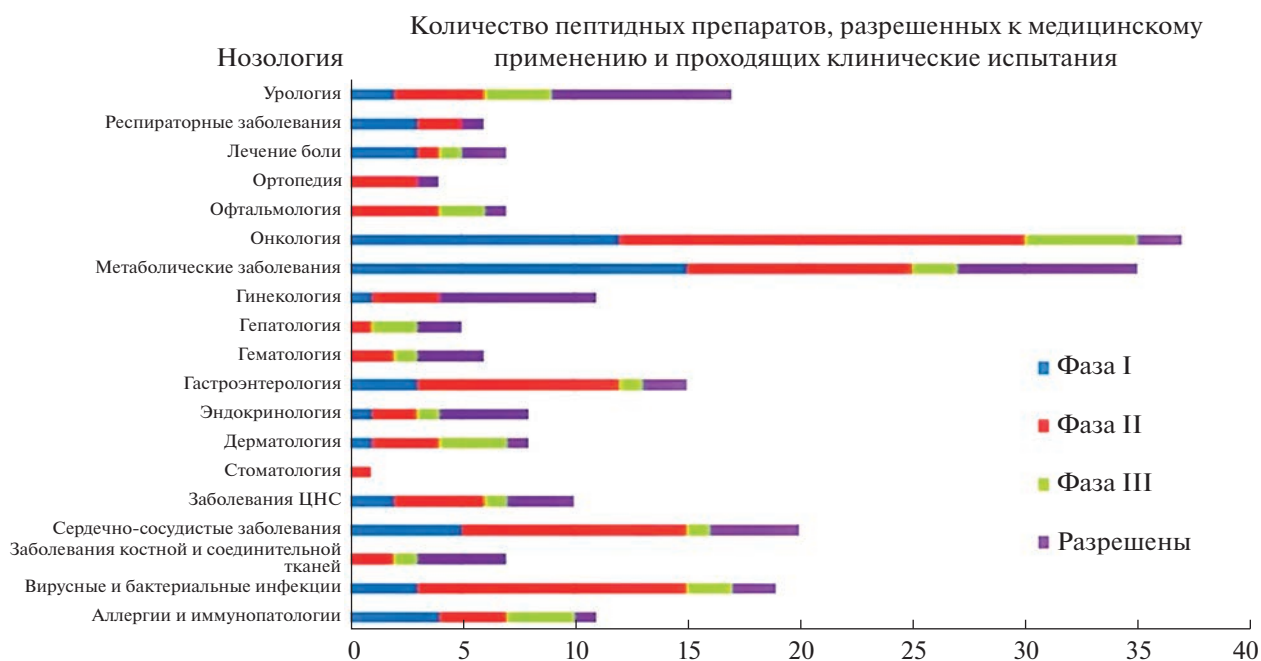


Рис. 2. Терапевтические области, в которых применяют пептидные препараты [23].

ций молекул, в том числе с использованием не-природных аминокислот, внедрением псевдопептидных связей и других модификаций, недоступных имеющимся рекомбинантным методам [22].

Пептиды исследуют по широкому спектру имеющихся и перспективных показаний, представляющих большой интерес для клинического применения. В настоящее время стратегия применения пептидных препаратов сместилась от гормональной терапии и диагностики рака в сторону лечения более широкого спектра заболеваний. Продолжает расти интерес к применению пептидов при таких заболеваниях, как диабет, остеопороз, сердечно-сосудистые заболевания, анемия, синдром раздраженного кишечника, болезнь Кушинга, рассеянный склероз и др. (рис. 2) [23].

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Несмотря на то что рынок пептидно-белковых лекарственных препаратов занимает небольшую часть (2%) мирового рынка лекарств, количество разрешенных пептидно-белковых препаратов увеличивается интенсивнее, чем остальной рынок традиционных лекарств [23]. Производство пептидов и белков сложное и более дорогостоящее [24] по сравнению с малыми молекулами, которые относительно легче синтезировать, поэтому такие препараты обычно более дешевые, чем пептидно-белковые.

Пептиды, как правило, имеют низкую проницаемость через клеточные мембраны, ограниченную стабильность и низкую пероральную биодоступность, поэтому преимущественный путь их введения в организм — это подкожные (SC), внутримышечные (IM) или внутривенные (IV) инъекции. В настоящее время увеличивается количество разработок пептидных препаратов, применяемых интраназально в виде капель и/или спреев [25].

Сравнение положительных и отрицательных свойств пептидов и химических молекул приведено в табл. 1.

На начальных этапах развития пептидной фармацевтики малочисленность зарегистрированных пептидных лекарственных препаратов по сравнению с малыми химическими молекулами была обусловлена несколькими объективными факторами. К ним относятся короткий период полувыведения многих пептидных молекул, которые были первыми синтетическими пептидными лекарственными средствами, из-за присутствия в организме многочисленных пептидаз и экскреторных механизмов, гидролизующих природные пептиды. Еще одним препятствием, замедлявшим внедрение пептидов в качестве лекарственных средств, выступает низкая пероральная биодоступность [26–28]. Поскольку пероральная доставка часто рассматривается как предпочтительная для пациентов, наличие на ранних этапах только парентеральных форм сделала пептидные лекарственные препараты менее привлекательным вариантом в случае необходимости их хро-

Таблица 1. Сравнение положительных и отрицательных свойств пептидов и химических молекул

	Химические молекулы		Пептиды
	80% рынка		2% рынка
+	Низкая себестоимость синтеза	–	Высокая себестоимость синтеза
+	Высокая мембранная проницаемость	–	Низкая мембранная проницаемость
+	Высокая стабильность <i>in vivo</i>	–	Низкая стабильность <i>in vivo</i>
+	Высокая биодоступность <i>per os</i>	–	Низкая биодоступность <i>per os</i>
		–	Низкая гидролитическая стабильность
		–	Ограниченность способов введения в организм
–	Высокая вероятность перекрестного взаимодействия с другими мишенями (рецепторами)	+	Низкая вероятность перекрестного взаимодействия с другими мишенями (рецепторами)
		+	Высокая селективность и аффинность к рецепторам
		+	Легкость идентификации структуры
		+	Множественность биомишеней <i>in vivo</i>
		+	Низкая токсичность и иммуногенность
		+	Меньшая конкуренция среди дженериков

нического амбулаторного приема. В ряде случаев пептиды становятся успешными препаратами, поскольку проявляют множественное (плейотропное) действие на различные мишени в организме [29].

Новые стратегии химического синтеза и адресной доставки препаратов позволяют изменять фармакокинетические, физическо-химические свойства и специфичность молекулы. Для этого проводят модификации аминокислот или пептидной цепи, включение неприродных аминокислот, конъюгацию пептидов с носителями для увеличения периода полувыведения или улучшения растворимости [30, 31].

Отметим, что синтез пептидов – это одно из самых сложных направлений синтетической органической химии, поскольку получение простейшего пептида, состоящего из двух аминокислот, требует до четырех стадий синтеза. Химия пептидов, как раздел органической химии, постепенно развивалась в мире наряду с совершенствованием общих методов органического синтеза и очистки.

В “допептидную эру” большой прорыв в направлении развития пептидной химии произошел в середине 1950-х гг. Ученым удалось выделить в индивидуальном виде ряд пептидных гормонов и белков и установить их химические структуры.

Впервые, в начале 1950-х гг., под руководством В. дю Винье после установления структуры гормона окситоцина был осуществлен его полный химический синтез [32]. Эта работа увенчалась Нобелевской премией по химии в 1955 г. “за выделение, структурную идентификацию и общий

синтез циклического пептида окситоцина” [33]. Успехи команды В. дю Винье заложили фундамент пептидной фармацевтики. Усилия исследователей во многих странах были направлены на выделение биологически активных пептидов из различных организмов, установление их строения и воспроизведение синтетическим путем.

Несмотря на все сложности синтеза, отсутствие индустрии обеспечения специализированными реактивами и эффективной системы очистки получаемых пептидных молекул, в мире стали разрабатывать не только лабораторные, но и технологические методы для создания промышленного производства лекарственных препаратов на основе пептидов.

Индивидуальные синтетические пептидные лекарственные препараты появились на мировом фармацевтическом рынке в начале 1960-х гг. Большие усилия были приложены для получения первых синтетических гормонов: окситоцина, вазопрессина, производных лютеинизирующего гормона. Впоследствии в ряде лабораторий начались “состязания” по первому синтезу белка. Группами американских (Р. Меррифилд) и западногерманских (Г. Цан) химиков практически одновременно был завершён полный синтез инсулина – первый химический синтез белка [34].

Фактически регулярное внедрение в практику синтетических пептидных лекарственных препаратов началось в начале 1970-х гг. Зарубежные компании выводили на фармацевтический рынок пептидные гормоны, антибиотики, противоопухолевые препараты.

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Механизм действия биологически активных веществ обычно заключается в их взаимодействии со специфическими рецепторами. Каждый рецептор обладает характерной пространственной структурой участка, взаимодействующего с биологически активным веществом, и их структуры должны соответствовать друг другу, учитывая не только последовательность аминокислот, но и стереоспецифичность по отношению к активному центру рецептора. У большинства лекарственных препаратов существует прямая взаимосвязь между пространственной структурой, стереоспецифичностью и фармакологической активностью.

Многие синтетические ксенобиотики (непептидные лекарственные препараты) существуют в виде смеси двух или большего числа пространственных изомеров, отличающихся своими биологическими свойствами. Такие рацемические препараты могут вызывать серьезные побочные эффекты (известный пример — препарат Талидомид [35]). Выявление фармакокинетических и фармакодинамических особенностей отдельных изомеров открывает перспективы для совершенствования уже известных лекарственных средств. Лишь 15% синтетических химических препаратов, находящихся на европейских рынках, производится в виде отдельных стереоизомеров, остальные 85% представляют собой смеси изомеров. В то же время пептидные препараты получают, как правило, в виде индивидуальных изомеров и выбирать из них те, которые обладают наиболее выраженными эффектами и/или наименьшей токсичностью [36, 37].

Поскольку природные пептиды легко гидролизуются протеазами, которые распространены по всему организму, то протеолиз — основной путь элиминации большинства пептидов. Поэтому важно определять основные структурные свойства при взаимодействии между пептидом и его мишенью, чтобы проводить успешные модификации с целью повышения стабильности и сохранения биологической активности исследуемого соединения в качестве кандидата на создание лекарственного препарата. Природные немодифицированные пептиды имеют короткий период полураспада [4] и низкую проницаемость через клеточные мембраны, поэтому их активность ограничена, как правило, внеклеточными мишенями [23, 38]. Но даже при таких ограничениях, благодаря уникальным свойствам, пептиды остаются перспективными кандидатами для разработки новых лекарственных средств. Преимущество природных пептидов перед ксенобиотиками — высокие константы связывания с белковыми мишенями, легкая идентификация субстрата связывания, высокая целевая

специфичность, широкий спектр клинического применения, низкая токсичность и иммуногенность и многие другие [38]. Низкая пероральная биодоступность (<1%) [40, 41] немодифицированных пептидов в основном обусловлена коротким периодом полураспада (минуты), вызванным протеолизом в крови, почках или печени, а также быстрым почечным клиренсом при первичном прохождении желудочно-кишечного тракта и печени [23, 40, 42]. Несмотря на сложность разработки перорально стабильных пептидов и пептидомиметиков, во многих лабораториях интенсивно разрабатываются такие препараты [43, 44]. Подходы к повышению стабильности пептидов постоянно совершенствуются, создавая новые варианты структурных модификаций. Одним из очевидных решений стабилизации гидролитической лабильности лекарственных препаратов, содержащих природные пептиды, выступает синтез модифицированных аналогов природных пептидов, ранее зарегистрированных как парентеральные лекарственные средства. Модификации аналогов основаны на введении замен в различные части исходной молекулы для стабилизации, а иногда и изменения ее структуры, спектра и даже направления действия, с перспективой получения нового поколения препаратов с улучшенными фармацевтическими свойствами.

СТРАТЕГИИ ПОВЫШЕНИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ПЕПТИДОВ

Замена природных аминокислот — одна из стратегий, используемых для предотвращения гидролиза; для этого проводят модификации по сайтам, подвергающимся гидролизу, с последующим замещением исходной аминокислоты [10]. В качестве заместителей могут быть D-аминокислоты, β-аминокислоты, дегидроаминокислоты и другие не природные производные аминокислот, а также различные производные олефинов. Такие модификации способствуют улучшению стабильности и увеличению периода полувыведения препаратов из плазмы [41, 43, 45, 46].

Описаны примеры, когда устойчивые к деградации протеазами пролин и гидроксипролин вводили в места расщепления, заменяя легко подвергающиеся гидролизу аминокислоты, что улучшало стабильность препарата в организме [46, 47]. Для этих же целей также использовали N-метилирование или введение N-метил-аминокислот [48, 49].

Одновременное включение D-аминокислот и N-метилирование амидных связей может значительно повысить метаболическую стабильность, создавая дополнительные стерические препятствия. Известно много структурных модификаций, включающих N-алкилирование, для повы-

шения биологической активности и метаболической стабильности пептидов [50–55].

Множество протеолитических ферментов в крови, плазме, печени или почках — экзопептидазы, аминопептидазы и карбоксипептидазы — гидролизуют пептидные последовательности с *N*- и *C*-концов. Поэтому *N*-ацилирование и *C*-амидирование часто также повышают устойчивость модифицированных пептидов к протеолизу [50–55].

Общепринятым вариантом для повышения жесткости, образования внутримолекулярных водородных связей и уменьшения межмолекулярного гидратирования выступает циклизация линейных молекул [50–55].

Деградация экзопептидазами может быть подавлена путем введения *N*-концевых *D*-аминокислот, восстановления *C*-концевого карбоксила в соответствующий спирт [50–55].

Получает распространение метод химических “сшивок” боковых групп аминокислот в пептидной цепи посредством “сшивки” боковых остатков аминокислот в цепи углеводородными “вставками” либо образованием лактамных мостиков для стабилизации спиральности, повышения стабильности и внутриклеточной проницаемости пептидов, так называемый метод “stapled peptides” [50–55].

Еще один современный подход для повышения стабильности и создания пролонгированной формы нового соединения — конъюгация пептидов с макромолекулами. Для этих целей применяют различные полимеры, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ) [50–55]. ПЭГилирование пептидов позволяет эффективно снижать потенциальную иммуногенность, сохранять биологическую активность и замедлять их ферментативный гидролиз [50–55]. Для стабилизации пептидов и защиты от протеолиза используют некоторые жирные кислоты, с которыми конъюгируют пептиды, или инкапсулируют пептид в липосомы, нано/микрочастицы или мицеллы с большей молекулярной массой. Метод конъюгации приводит к увеличению периода полураспада и повышению биодоступности пептидных препаратов. В результате конъюгации пептидов с липидами получают липопептидные производные, сочетающие биологические свойства пептидов и липидов и обладающие улучшенной эффективностью и селективностью. Липидизация пептидов приводит к образованию амфифильных пептидных конъюгатов с повышенной биодоступностью и увеличению их транспорта через клеточные мембраны [50–55].

В последнее время получила распространение новая концепция создания полноразмерных энантиомерных *D*-пептидов, замещающих все соответствующие *L*-аминокислоты. Такие пептиды (*D*-пептиды) увеличивают период полураспада

целевого продукта и значительно улучшают его стабильность [55, 56].

Один из первых классических примеров успешных модификаций природных пептидных молекул — гормон вазопрессин, содержащий *L*-Arg и имеющий период полураспада у человека 10–35 мин [57]. Аналог вазопрессина, в котором *L*-Arg заменен на *D*-Arg, получил название десмопрессин, и его период полураспада составляет ~4 ч [58]. Похожий пример — октреотид — это аналог соматостатина, применяемого для лечения желудочно-кишечных опухолей. Этот пептид имеет укороченную последовательность соматостатина (8 вместо 14 а.о.) и с заменами *L*-аминокислот *D*-аминокислотами (рис. 3) [59, 60].

СИНТЕЗ ЦИКЛИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ И ПЕПТИДОМИМЕТИКОВ

Минимальные циклические структуры пептидных соединений — 2,5-дикетопиперазины (2,5-ДКП), представляющие собой циклодипептиды, полученные конденсацией двух α -аминокислот (рис. 4).

На основе ДКП можно генерировать большое число различных структур для поиска новых лидерных соединений [61]. Производные 2,5-ДКП часто встречаются (как в виде простых незамещенных 2,5-ДКП-структур, так и более сложных молекулярных конструкций) в разнообразных натуральных продуктах, грибах, бактериях, во многих растениях и у млекопитающих. Множество антибиотиков — производные дикетопиперазинов [61]. В качестве примера можно привести лекарственные препараты от простых циклических дипептидов, таких как производное димера циклосерина или каиромицина В [62], до сложных сопряженных полиядерных систем, таких как бицикломицин [63, 64].

Сама природа создала молекулы, удобные для модификаций, поскольку 2,5-ДКП состоит из центрального фрагмента (центроида или scaffold), в который можно вводить различные заместители (рис. 5). 2,5-ДКП представляют собой шестичленные гетероциклические соединения с ограниченным конформационным набором положений. 2,5-ДКП устойчивы к протеолизу и весьма привлекательны для структурно-функциональных исследований при поиске новых потенциальных лекарственных препаратов. Эти конформационно ограниченные хиральные центроиды имеют шесть положений, доступных для структурной модификации различными функциональными группами с определенной стереохимией. Структура 2,5-ДКП позволяет проводить модификации не только по всем шести позициям молекулы, но и получать стереохимические изомеры по всем четырем положениям оптических

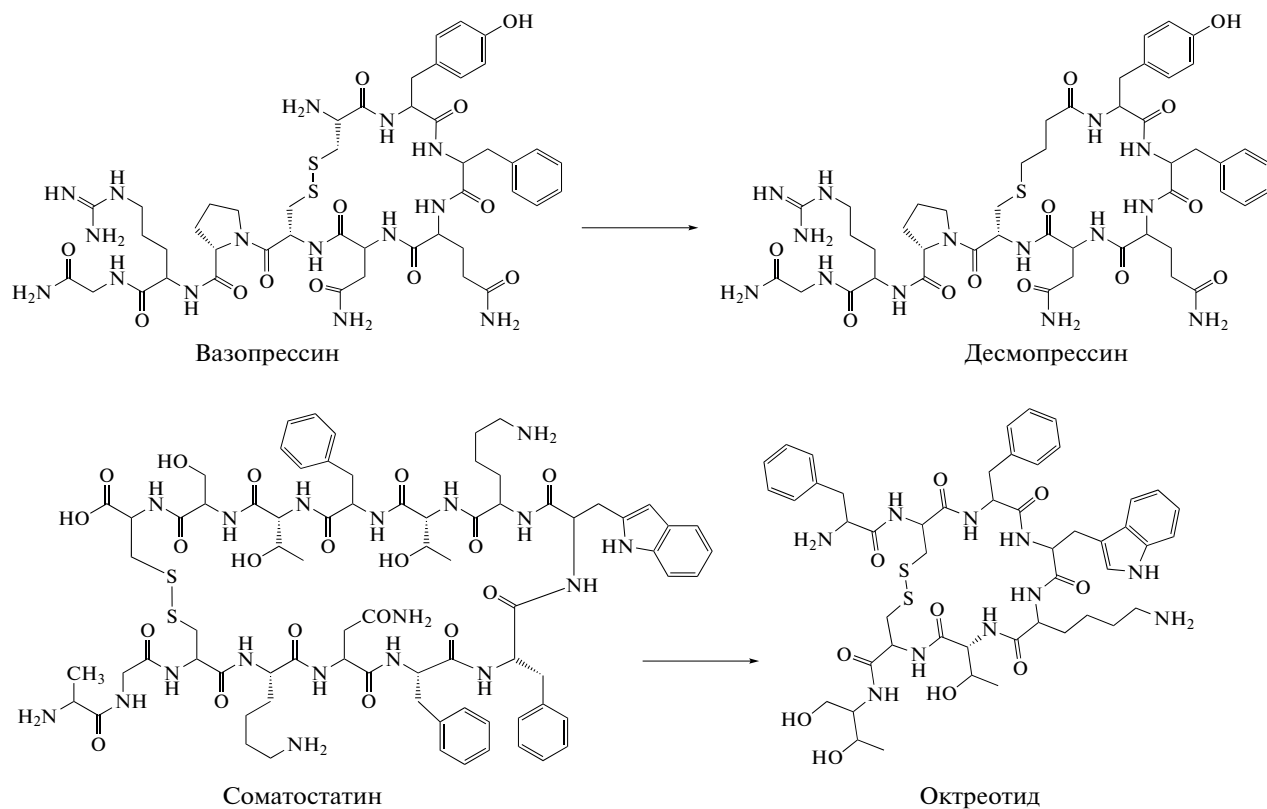


Рис. 3. Классический пример модификации гормонов вазопрессина и соматостатина [58, 59].

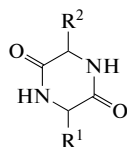


Рис. 4. Структура 2,5-дикетопиперазина (2,5-ДКП). R^1 и R^2 – боковые радикалы аминокислот.

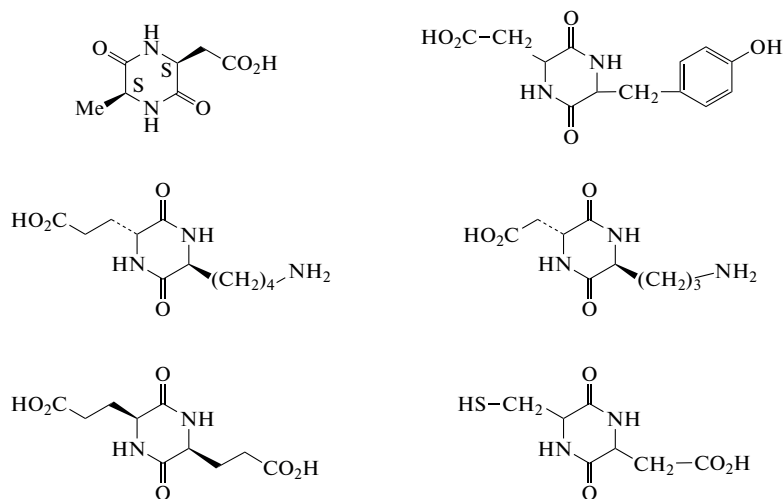


Рис. 5. Замещенные 2,5-ДКП-центроиды на основе трифункциональных аминокислот.

центров. 2,5-ДКП имеют жесткий каркас, способный имитировать предпочтительную конформацию, ограничивая подвижность аминокислот, встроенных в его структуру. 2,5-ДКП, состоящие из трифункциональных аминокислот, содержат различные функциональные группы, которые дополнительно могут быть использованы как для “нащупывания” положений мишени (с которыми эта молекула вступает во взаимодействие), так и служить линкерами для присоединения различных фармакофоров (рис. 6) [64].

Функциональные группы (фармакофоров) должны легко подвергаться метаболическим превращениям, например, при присоединении к центроиду сложноэфирными связями, чтобы легко гидролизоваться в организме. 2,5-ДКП относительно легко синтезировать и присоединять к ним большое разнообразие заместителей, которыми служат различные аминокислоты, используемые в качестве строительных блоков. Набор заместителей позволяет варьировать многие физико-химические характеристики молекулы, такие как строение, размер, форму, липофильность, дипольный момент, электростатический заряд, функциональные группы. Все это позволяет *in silico* моделировать структуры для направленного дизайна библиотек производных 2,5-ДКП [65].

Понимание влияния стерических особенностей на физиологическую активность молекулы позволяет с помощью стереоспецифичных методов синтеза получать лекарственные препараты, обладающие наибольшей эффективностью и/или наименьшей токсичностью. При поиске новых лидерных соединений следует избегать присутствия в центроиде или заместителях группировок, способных придавать получаемым соединениям токсические свойства. Одна из причин различающейся физиологической активности стереоизомеров лекарственных препаратов — разница в их проникновении в организм. Это может быть связано с особенностями строения 2,5-ДКП, свойствами биологических мембран, которые сами построены из оптически активного, асимметрического материала, а также с наличием в мембранах транспортных систем, осуществляющих перенос метаболитов через мембраны [66].

Получил распространение подход с использованием производных 2,5-ДКП [67] как в виде коротких аналогов пептидов, так и в виде “вставок” в различные положения цепи, с варьированием местоположения 2,5-ДКП в *N*-, *C*-конце молекулы или внутри пептидной цепи для повышения гидролитической стабильности и возможности перорального применения получаемой молекулы [68].

Примером таких модификаций могут служить исследования аналогов гормона холецистокинина (ССК). Производные ССК4 были синтезирова-

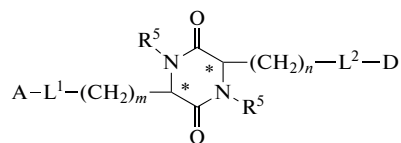


Рис. 6. Общая формула платформы для синтеза библиотек пептидомиметиков на основе замещенных 2,5-ДКП, где A, D — биологически активные фармакофоров или фрагменты пептидных соединений; L¹ и L² — биогидролизуемые линкеры; *m*, *n* — количество CH₂-групп (от 0 до 4); R⁵ — возможные производные фармакофоров, присоединенные по атомам азота. **S* или *R* — оптическая ориентация по положениям 3 и 6 атомов углерода [63].

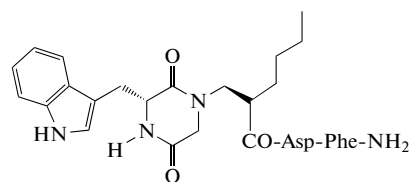


Рис. 7. Пептидомиметик — агонист гормона холецистокинина (ССК) [66].

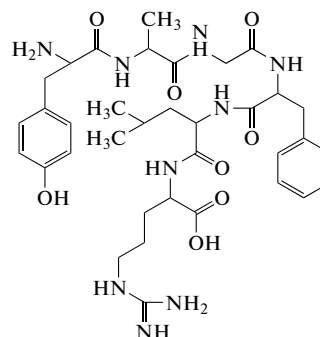


Рис. 8. Химическая структура Даларгина.

ны путем замены последовательности *N*-концевого дипептида Trp-Met на дикетопиперазиновое кольцо, полученное циклизацией аминокислот Gly и Trp, к которым далее по атому азота был присоединен трипептидный фрагмент Nle-Asp-Phe-NH₂ (рис. 7), показавший положительные результаты связывания и селективности с ССК-рецепторами [67]. Проведенные эксперименты показали, что активность проявлял только аналог с *R*-конфигурацией углерода, находящегося у C_α-атома индольного кольца, тогда как соединения с *S*-конфигурацией не имели сродства к ССК-рецепторам (рис. 8).

В процессе изучения биологической активности изомеров дипептида Glu-Trp были получены новые сведения о влиянии химической и оптиче-

ской структуры на биологические свойства этих изомеров. Показано, что L-Glu-L-Trp-OH, L-Glu-(L-Trp-OH)-OH, а также их структурные и стереоизомеры D-Glu-D-Trp-OH и D-Glu-(D-Trp-OH)-OH проявляют реципрокное действие на клетки тимуса (timoциты) *in vitro*: L-L-пептиды обладают иммуностимулирующими свойствами, а D-D-пептиды — иммунодепрессивными [69]. Позже мы показали, что L-Glu-L-Trp-ONa (Тимоген®) и его структурный и оптический D-изомер D-Glu-(D-Trp-OH)-ONa (Тимодепрессин®) оказывают сходное действие на гемопоэз: на гемопоэтических клетках-предшественниках *in vitro* и *in vivo* продемонстрировано, что L-L-пептиды обладают гемостимулирующими свойствами, а D-D-пептиды — гемосупрессорными [6].

Современные тенденции разработки пептидных лекарственных средств нового поколения демонстрируют растущий спрос на неинвазивные, предпочтительно пероральные, лекарственные формы. В лаборатории биофармацевтики ИБХ РАН разработан оригинальный метод создания пептидомиметиков на основе разветвленных 2,5-ДКП. Соответственно, была создана новая химическая платформа на основе разветвленных производных 2,5-ДКП для получения протеазорезистентных неинвазивных биологически активных пептидомиметиков [6, 64, 69]. Следуя этому подходу, были синтезированы серии перорально стабильных аналогов Тимогена®, эффективно стимулирующих восстановление нарушенного кроветворения и пролиферацию интактных клеток костного мозга [69], и перорально активных иммуно- и гемосупрессорных аналогов Тимодепрессина® [6].

Таким образом, производные биоактивных 2,5-ДКП привлекают все больший интерес исследователей, занимающихся поиском и разработкой новых лекарственных препаратов.

Возможности использовать для модификации все шесть положений гетероцикла и построение центроида из трифункциональных аминокислот позволили провести синтез ряда сложных структур, содержащих этот центроид. В результате сотрудничества различных специалистов удалось получить несколько новых лекарственных препаратов на основе 2,5-ДКП [65].

Методология химии пептидов постепенно развивалась в мире наряду с совершенствованием подходов к синтезу органических соединений. Большой прорыв в этом направлении произошел после первого успешного синтеза пептида окситоцина [32].

Как упоминалось выше, со времени первого синтеза окситоцина начался процесс создания мировой пептидной фармацевтики. Вскоре и в СССР стали развиваться работы в этом перспективном направлении. В конце 1960-х годов в

Москве, Ленинграде, Киеве были созданы лаборатории химии природных соединений, занимавшиеся исследованиями пептидов. Несмотря на все сложности синтеза, отсутствие специализированных реактивов и эффективной приборной базы для очистки получаемых пептидных молекул, в СССР стали разрабатывать не только лабораторные, но и технологические методы для создания лекарственных препаратов на основе пептидов. В лабораториях СССР также проводили синтез и исследования пептидов, структуры которых были установлены к тому времени — окситоцина, вазопрессина, АКТГ, соматостатина и др. [70, 71].

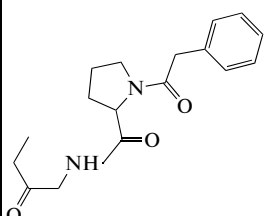
Зарубежные фармацевтические компании выводили на рынок пептидные гормоны, антибиотики, противоопухолевые препараты. В СССР не отставали от темпов исследований зарубежных коллег, также проводились работы по синтезу различных пептидов, депсипептидов, ионофоров и других пептидных соединений и созданию препаратов на их основе. Пионерами в этом направлении были ученые из Москвы (ИХПС АН СССР, ныне Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН), МГУ им. М.В. Ломоносова, Институт молекулярной генетики АН СССР, Институт фармакологии МЗ СССР), Ленинграда (ЛГУ, Институт высокомолекулярных соединений АН СССР и Институт особо чистых биопрепаратов — ВНИИ ОЧБ) и Новосибирска (НПО “Вектор”).

Первыми зарегистрированными в СССР в 1988 и 1989 гг. оригинальными отечественными пептидными лекарственными препаратами были Даларгин [72] (рис. 8) и Тимоген [73]. Даларгин стал первым в мире лекарством, созданным на основе синтетического нейропептида — аналога лейцин-энкефалина. Тимоген — природный иммунокорректор — пептид, первоначально выделенный из экстракта тимуса и впоследствии полученный синтетическим путем [73].

Была разработана промышленная технология получения пептидных лекарственных препаратов и налажено их производство на первом в СССР опытно-промышленном производстве биопрепаратов при Всесоюзном кардиологическом центре МЗ СССР. В это же время проводились работы по синтезу и созданию лекарственных препаратов в ряде других лабораторий и институтов страны. Были созданы препараты Семакс, Дельтаран, Ликопид, Иммунофан. В более позднее время на российский рынок вышли другие оригинальные препараты: Тимодепрессин, Селанк и Ноопепт [74–79].

В СССР и России за период до 2015 г. созданы и внедрены в производство ~30 оригинальных синтетических лекарственных препаратов, из них 14 препаратов представляют собой пептиды

Таблица 2. Отечественные оригинальные пептидные препараты

№	Препарат	Активное вещество	Показания к применению
1	Даларгин	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg	Противоязвенное средство
2	Тимоген	Glu-Trp	Иммуномодулятор
3	Семакс	Met-Glu-His-Phe-Gly-Pro	Инсульт и ишемия мозга
4	Ликопид	GLcNAc(β1–4)Mur NAc	Иммуномодулятор
5	Имунофан	Arg-α-Asp-Lys-Val-Tyr-Arg	Иммуномодулятор
6	Тимодепрессин	γ-D-Glu-D-Trp	Иммуносупрессор
7	Гепон	Thr-Glu-Lys-Lys-Arg-Arg-Glu-Thr-Val-Glu-Arg-Glu-Lys-Glu	Противовирусное средство
8	Седатин	Arg-Tyr-D-Ala-Phe-Gly	Стресс-протектор (разрешен в ветеринарии)
9	Бестим (аналог Тимогена)	γ-D-Glu-L-Trp	Иммуномодулятор
10	Ноопепт	Этиловый эфир <i>N</i> -фенилацетил-L-пролилглицина	Ноотропное средство
			
11	Дельтаран	Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu	Стресс-протектор
12	Стемокин	Ile-Glu-Trp	Стимулятор гемопоэза, иммуномодулятор
13	Селанк	Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly	Анксиолитик (транквилизатор)
14	Аллокин-альфа	His-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Gln-His-Gly-Val-His-Gly	Иммуномодулятор

(табл. 2). Если сравнить достижения тех лет отечественных разработчиков с зарубежными, то получится, что из ~5000 химических препаратов ~15 отечественных (~0.1%), а из 80 пептидных препаратов – 14 отечественных, что составляло почти 20% процентов мировых разработок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные этапы развития химии пептидов и понимание важной роли этих соединений в процессах жизнедеятельности практически всех живых организмов создали предпосылки для интенсивной разработки методов анализа, синтеза и практического применения пептидов в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве. Последовательное внедрение пептидных лекарственных препаратов в медицинскую и ветеринарную практику стимулировало создание современной научной, технологической и клинической базы для расширения исследований “от идеи до аптеки”, и постепенно было сформировано пептидное направление биофармацевтики. Учитывая значительные успехи советских и российских пептидных исследований и разработок, есть надежда,

что образовавшееся отставание от международных пептидных лабораторий будет преодолено, и отечественная биофармацевтика возобновит свое успешное развитие.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fischer E. // Untersuchungen über Aminosäuren / Polypeptide und Proteine (1899–1906). Springer, Berlin, 1906.
2. Bliss M. // Discovery of Insulin. University of Chicago Press: Chicago, IL, 1982. P. 28–37.
3. Padhi A., Sengupta M., Sengupta S., Roehm K.H., Sonawane A. // Tuberculosis (Edinb). 2014. V. 94.

- P. 363–373.
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.03.011>
4. *Kaspar A.A., Reichert J.M.* // *Drug Discov. Today*. 2013. V. 18. P. 807–817.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.05.011>
5. *Schulte I., Tammen H., Selle H., Schulz-Knappe P.* // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2005. V. 5. P. 145–157.
<https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.145>
6. *Deigin V.I., Semenets T.N., Zamulaeva I.A., Maliutina Ya.V., Selivanova E.I., Saenko A.S., Semina O.V.* // *Int. Immunopharmacol.* 2007. V. 7. P. 375–382.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.11.010>
7. *Thundimadathil J.* // *J. Amino Acids*. 2012. V. 2012. P. 967347.
<https://doi.org/10.1155/2012/967347>
8. *Puente X.S., Gutierrez-Fernandez A., Ordonez G.R., Hillier LaD.W., Lopez-Otin C.* // *Genomics*. 2005. V. 86. P. 638–647.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.07.009>
9. *Gongora-Benitez M., Tulla-Puche J., Albericio F.* // *Chem. Rev.* 2014. V. 114. P. 901–926.
<https://doi.org/10.1021/cr400031z>
10. *Sun L.* // *Mod. Chem. Appl.* 2013. V. 1. P. e103.
<https://doi.org/10.4172/mca.1000e103>
11. *Goodwin D., Simerska P., Toth I.* // *Curr. Med. Chem.* 2012. V. 19. P. 4451–4461.
<https://doi.org/10.2174/092986712803251548>
12. *Craik D.J., Fairlie D.P., Liras S., Price D.* // *Chem. Biol. Drug Des.* 2013. V. 81. P. 136–147.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.12055>
13. *Moore A.* // *EMBO Rep.* 2003. V. 4. P. 114–117.
<https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor748>
14. *Mains R.E., Eipper B.A.* // *The Neuropeptides*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. P. 79–92.
15. *Harris R.M., Dijkstra P.D., Hofmann H.A.* // *Gen. Com. Endocrinol.* 2014. V. 195. P. 107–1015.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.10.007>
16. *Cati K.J., Dufau M.I.* // *Biol. Reprod.* 1976. V. 14. P. 1–15.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod14.1.1>
17. *Schulz-Knappe P., Schrader M., Zucht H.-D.* // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2005. V. 8. P. 697–704.
<https://doi.org/10.2174/138620705774962418>
18. *Lau J.L., Dunn M.K.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2017. V. 25. P. 2700–2707.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>
19. *Rodland K.D.* // *Clin. Biochem.* 2004. V. 37. P. 579–583.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.05.011>
20. *Veenstra T.D., Prieto D.A., Conrads T.P.* // *Drug Discov. Today*. 2004. V. 9. P. 889–897.
[https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(04\)03246-5](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(04)03246-5)
21. *Levy O.E., Jodka C.M., Ren S.S., Mamedova L., Sharma A., Samant M., D'Souza L.J., Soares C.J., Yuskina D.R., Jin L.J., Parkes D.G., Tatarkiewicz K., Ghosh S.S.* // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e87704.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087704>
22. *Vlieghe P., Lisowski V., Martinez J., Khrestchatisky M.* // *Drug Discov. Today*. 2010. V. 15. P. 40–56.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.10.009>
23. *Henninot A., Collins J.C., Nuss J.M.* // *J. Med. Chem.* 2018. V. 61. P. 1382–1414.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00318>
24. *Smith A.J.* // *J. Biomol. Screen.* 2015. V. 20. P. 437–453.
<https://doi.org/10.1177/1087057114562544>
25. *Li D.* // *AAPS J.* 2015. V. 17. P. 134–143.
<https://doi.org/10.1208/s12248-014-9687-3>
26. *Ahmed H.B., Teruna J.S.* // *Clin. Immunol.* 2012. V. 144. P. 127–138.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.05.010>
27. *Agyei D., Ahmed I., Akram Z., Iqbal H.M.N., Danquah M.K.* // *Protein Pept. Lett.* 2017. V. 24. P. 94–101.
<https://doi.org/10.2174/0929866523666161222150444>
28. *Agyei D., Danquah M.K.* // *Biotechnol. Adv.* 2011. V. 29. P. 272–277.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.001>
29. *Romani L., Moretti S., Fallarino F., Bozza S., Ruggeri L., Casagrande A., Aversa F., Bistoni F., Velardi A., Garaci E.* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2012. V. 1269. P. 1–6.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06716.x>
30. *Craik D.J., Fairlie D.P., Liras S., Price D.* // *Chem. Biol. Drug Des.* 2013. V. 81. P. 136–147.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.12055>
31. *Fosgerau K., Hoffmann T.* // *Drug Discov. Today* 2015. V. 20. P. 122–128.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>
32. *du Vigneaud V., Ressler C., Swan J.M., Roberts C.W., Katsoyannis P.G.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1954. V. 76. P. 3115–3121.
<https://doi.org/10.1021/ja01641a004>
33. The Nobel Prize in Chemistry 1955. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2018.
<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1955/summary>
34. *Belgi A., Hossain M., Tregear G.W., Wade J.D.* // *Immun. Endoc. Metab. Agents Med. Chem.* 2011. V. 11. P. 40–47.
<https://doi.org/10.2174/187152211794519412>
35. *Vargesson N.* // *Birth Defect. Res. C Embryo Today*. 2015. V. 105 P. 140–156.
<https://doi.org/10.1002/bdrc.21096>
36. *Zompra A.A., Galanis A.S., Werbitzky O., Albericio F.* // *Future Med. Chem.* V. 1. P. 361–372.
<https://doi.org/10.4155/fmc.09.23>
37. *Bray B.L.* // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003. V. 2. P. 587–593.
<https://doi.org/10.1038/nrd1133>
38. *Lax R.* // *Int. Pept. Rev.* 2010. V. 2. P. 10–15.
<https://doi.org/10.3390/md15040124>
39. *Di L.* // *AAPS J.* 2015. V. 17. P. 134–143.
<https://doi.org/10.1208/s12248-014-9687-3>
40. *Zhou X.H., Li W., Po A.* // *Int. J. Pharm.* 1991. V. 75. P. 117–130.
41. *Maher S., Brayden D.J.* // *Drug Discov. Today Technol.* 2012. V. 9. P. e113–e119.
<https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2011.11.006>

42. Diao L., Meibohm B. // Clin. Pharmacokinet. 2013. V. 52. P. 855–868.
<https://doi.org/10.1007/s40262-013-0079-0>
43. Chin J., Foyez Mahmud K.A., Kim S.E., Park K., Byun Y. // Drug Dis. Today Technol. 2012. V. 9. P. e105–e112.
<https://doi.org/10.1007/s40199-019-00316-w>
44. Rader A.F.B., Reichart F., Weinmüller M., Kessler H. // Bioorg. Med. Chem. 2018. V. 26. P. 2766–2773.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.08.031>
45. Ratnaparkhi M.P., Chaudhari S.P., Pandya V.A. // Int. J. Curr. Pharmaceut. Res. 2011. V. 3. P. 1–9.
46. Wohr T., Wahl F., Nefzi A., Rohwedder B., Sato T., Sun X., Mutter M. // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. P. 9218–9227.
<https://doi.org/10.1021/ja961509q>
47. Harris P.W.R., Kowalczyk R., Hay D.L., Brimble M.A. // Int. J. Pept. Res. Ther. 2013. V. 19. P. 147–155.
<https://doi.org/10.1007/s10989-012-9325-9>
48. Munegumi T. // Chem. Biodivers. 2010. V. 7. P. 1670–1679.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.200900370>
49. Ano R., Kimura Y., Shima M., Matsuno R. // Bioorg. Med. Chem. 2004. V. 12. P. 257–264.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.10.002>
50. Sato A.K., Viswanathan M., Kent R.B., Wood C.R. // Curr. Opin. Biotechnol. 2006. V. 17. P. 638–642.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.10.002>
51. Rand A.C., Leung S.S.F., Eng H., Rotter C.J., Sharma R., Kalgutkar A.S., Zhang Y., Varma M.V., Farley K.A., Khunte B., Limberakis C., Price D.A., Liras S., Mathiozetz A.M., Jacobson M.P., Lokey R.S. // MedChemComm. 2012. V. 3. P. 1282–1289.
<https://doi.org/10.1039/c2md20203d>
52. Jevsevar S., Kunstelj M., Porekar V.G. // Biotechnol. J. 2010. V. 5. P. 113–128.
<https://doi.org/10.1002/biot.200900218>
53. Ward B.P., Ottaway N.L., Perez-Tilve D., Ma D., Gelfanov V.M., Tschop M.H., DiMarchi R.D. // Mol. Metab. 2013. V. 2. P. 468–479.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.08.008>
54. Verdine G.L., Hilinski G.J. // Method. Enzymol. V. 503. P. 3–34.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-396962-0.00001-x>
55. Rink R., Arkema-Meter A., Baudoin I., Post E., Kuipers A., Nelemans S.A., Akanbi M.H.J., Moll G.N. // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 2010. V. 61. P. 210–218.
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.02.010>
56. Tugyi R., Uray K., Ivan D., Fellinger E., Perkins A., Hudecz F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 413–418.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0407677102>
57. Sharman A., Low J. // Pain. 2008. V. 8. P. 134–137.
58. Agerso H., Larsen L.S., Riis A., Lovgren U., Karlsson M.O., Senderovitz T. // Br. J. Clin. Pharmacol. 2004. V. 58. P. 352–358.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2004.02175.x>
59. Harris A.G. // Gut. 1994. V. 35 (Suppl. 3). P. S1–S4.
https://doi.org/10.1136/gut.35.3_suppl.s1
60. Anthony L., Freda P.U. // Curr. Med. Res. Opin. 2009. V. 25. P. 2989–2999.
<https://doi.org/10.1185/03007990903328959>
61. Milne P.J., Kilian G. // Diketopiperazines. Compr. Nat. Prod. II. Elsevier: Amsterdam, 2010. V. 5. P. 657–698.
<https://doi.org/10.3390/biom11101515>
62. Dictionary of Antibiotics and Related Substances / Ed. Bycroft B.W. Chapman Hall: London, 1988. P. 906.
63. Borthwick A.D. // Chem. Rev. 2012. V. 112. P. 3641–3716.
<https://doi.org/10.1021/cr200398y>
64. Deigin V., Ksenofontova O., Khrushev A., Yatskin O., Goryacheva A., Ivanov V. // ChemMedChem. 2016. V. 11. P. 1974–1977.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201600157>
65. Zhao S., Smith K.S., Deveau A.M. // J. Med. Chem. 2002. V. 45. P. 1559.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.02.050>
66. Prasad C. // Peptides. 1995. V. 16. P. 1151.
67. Shiosaki K., Craig R., Lin C. // Peptides / Ed. Marshall G.R. ESCOM: Leiden, Holland, 1990. P. 978.
68. Pierschbacher M.D., Ruoslahti E. // Nature. 1984. V. 309. P. 30–33.
<https://doi.org/doi:10.1038/309030a0>
69. Deigin V., Ksenofontova O., Yatskin O., Goryacheva A., Ignatova A., Feofanov A., Ivanov V. // Int. Immunopharmacol. 2020. V. 81. P. 106185.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106185>
70. Шубина Т.А., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Ляпина Л.А., Ульянов А.М., Оберган Т.Ю., Пасторова В.Е. // Бюлл. эксперим. биол. мед. 2012. Т. 153. С. 304–307.
71. Tsai S.J. // Med. Hypotheses. 2007. V. 68. P. 1144–1146.
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.07.017>
72. Lasukova T.V., Maslov L.N., Podoksenov Y.K., Podoksenov A.Y., Platonov A.A., Ovchinnikov M.V., Bespalova Zh.D. // Bull. Exp. Biol. Med. 2004. V. 137. P. 27–30.
<https://doi.org/10.1023/b:bebm.0000024378.48252.fb>
73. Клиническая фармакология Тимогена / Под ред. Смирнова В.С. СПб.: ФАРМин-декс, 2004. 172 с.
74. Tukhovskaya E.A., Shaykhutdinova E.R., Ismailova A.M., Slashcheva G.A., Prudchenko I.A., Mikhaleva I.I., Khokhlova O.N., Murashev A.N., Ivanov V.T. // Biomedicines. 2021. V. 9. P. 407–422.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9040407>
75. Meshcheryakova E., Guryanova S., Makarov E., Alekseeva L., Andronova T., Ivanov V. // Int. Immunopharmacol. 2001. V. 1. P. 1857–1865.
[https://doi.org/10.1016/s1567-5769\(01\)00111-4](https://doi.org/10.1016/s1567-5769(01)00111-4)
76. Lebedev V.V., Danilina A.V., Sgibova I.V. // Int. J. Immunorehabilitat. 2000. V. 2. P. 146–151.
77. Виноградова Ю.Е., Замулаева И.А., Павлов В.В., Селиванова Е.И., Дейгин В.И., Смирнова С.Г., Орлова Н.В., Саенко А.С. // Терапевтический архив. 2002. № 8. С. 64–67.
78. Телешова Е.С., Бочкарев В.К., Сюняков Т.С., Бугаева Т.П., Незнамов Г.Г. // Психиатрия. 2010. № 4. С. 26–35.
79. Амелин А.В., Илюхина А.Ю., Шмонин А.А. // Журн. невролог. психиатр. им. С.С. Корсакова. 2011. Т. 111. С. 44–46.

Evolution of Peptide Biopharmaceuticals

V. T. Ivanov* and **V. I. Deigin*, #**

Phone +7 (985) 920-71-44; e-mail: vdeigin8@gmail.com

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

Peptides are small molecule substances involved in numerous essential physiological functions such as human growth and development, stress, regulation of the emotional state, sexual behavior, and immune responses. Their mechanisms of action are based on receptor-ligand interaction, which leads to highly selective effects. These properties and low toxicity allow them to be considered potent drugs. The production of peptide preparations became possible at the beginning of the 20th century after a method for the selective synthesis of peptides was developed. However, after the successful synthesis of the first peptide drugs, many issues related to increasing stability, bioavailability, half-life, and the ability to move through cell membranes remained unresolved. The review considers the historical path of development of the synthesis and production of peptides, as well as modern approaches to the creation of peptide drugs and their use in biopharmaceutics, including the development of original peptide drugs in Russia.

Keywords: peptide synthesis, biological activity, cyclopeptides, peptidomimetics



ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ В ЭПОХУ ГЛОБАЛЬНОГО РАСПРОСТРАНЕНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ¹

© 2023 г. В. Н. Сафронова*, И. А. Болосов*, П. В. Пантелеев*,
С. В. Баландин*[#], 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

Поступила в редакцию 24.11.2022 г.

После доработки 04.12.2022 г.

Принята к публикации 06.12.2022 г.

В эпоху нарастания глобальной угрозы антибиотикорезистентности антимикробные пептиды (АМП) рассматриваются в качестве перспективных соединений, на основе которых могут быть созданы лекарственные средства нового поколения для борьбы с различными инфекционными заболеваниями. В данном обзоре АМП рассматриваются в качестве альтернативы традиционным антибиотикам, многие из которых уже утратили или постепенно теряют свою эффективность в отношении ряда важнейших патогенных микроорганизмов. Недавние вспышки вторичных инфекций на фоне пандемии COVID-19 обострили интерес к АМП в связи с острой нехваткой эффективных агентов против возбудителей бактериальных и грибковых инфекций. В обзоре обоснована актуальность поиска и исследования новых АМП, обобщены актуальные данные о клинических исследованиях АМП, приведен перечень разработанных на их основе препаратов, находящихся на различных этапах клинических исследований или уже завершивших клинические испытания в качестве средств для лечения различных инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: антимикробные пептиды (АМП), инфекционные заболевания, антибиотикорезистентность, множественная лекарственная устойчивость, пептидные препараты, клинические исследования

DOI: 10.31857/S0132342323030181, EDN: PEADRY

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	243
СТРУКТУРНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ АМП.....	244
ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ АМП, ПРОХОДЯЩИЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ.....	245
ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ АМП В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ.....	253
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	254
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	255

ВВЕДЕНИЕ

Открытие антибиотиков в XX веке произвело революцию во многих областях медицины, одна-

ко бесконтрольное применение этих соединений в последние десятилетия привело к распространению устойчивых штаммов бактерий [1]. Примечательно, что со времени введения в медицинскую практику хинолонов в 1960-х гг. не было открыто ни одного класса антибиотиков с широким спектром действия, а за последние 20 лет был открыт лишь один антибиотик нового класса — теиксобактин. Важно отметить, что в условиях глобальной пандемии критически возрастает нагрузка на систему здравоохранения, что, в конечном счете, может привести к резкому росту смертности от вторичных внутрибольничных инфекций (ВБИ). В ряду различных ВБИ наибольшее распространение имеют возбудители пневмонии, инфекции мочевыводящих путей, кожи и мягких тканей. Ключевыми представителями ВБИ выступают патогены так называемой ESKAPE-группы (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp.) [2]. На сегодняшний день зарегистрированы случаи устойчивости ко всем известным классам антибиоти-

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: АМП — антимикробные пептиды; ВБИ — внутрибольничные инфекции; ЛПС — липополисахарид.

[#] Автор для связи: (эл. почта: arenicin@mail.ru).

ков у таких грамотрицательных бактерий, как *A. baumannii* и *P. aeruginosa*. Один из механизмов реализации хронического инфекционного процесса — формирование сообществ бактерий в виде биопленок, обладающих повышенной устойчивостью к антибиотикам.

В сложившейся ситуации необходима разработка принципиально иных подходов для поиска новых соединений и терапии бактериальных инфекций (так называемых “платформ” [3]): 1) поиск специфических молекулярных мишеней с использованием методов биоинформатики; 2) высокопроизводительный скрининг природных и синтетических антибиотиков, нацеленных на эти мишени; 3) рациональный дизайн гибридных антибиотиков; 4) разработка подходов по созданию пролекарств, активируемых клетками-мишенями; 5) разработка препаратов, нейтрализующих факторы вирулентности; 6) разработка препаратов на основе эндолизинов бактериофагов; 7) поиск генных кластеров, кодирующих или регулирующих синтез новых рибосомально синтезируемых бактериоцинов (RiPPs), а также нерибосомальных пептидов (NRPs); 8) разработка технологий для выращивания “некультивируемых” микроорганизмов, например, входящих в состав почвенных или морских сообществ, а также микробиомов животных с последующим прямым поиском в них новых антибиотиков [4–7].

В последние годы значительное внимание ведущих мировых научных групп и фармацевтических компаний уделяется еще одному подходу — поиску и разработке широкой панели антибиотиков на основе катионных антимикробных пептидов (АМП) [8, 9]. Данные соединения синтезируются на рибосоме и выступают ключевыми молекулярными факторами врожденного иммунитета животных, растений и грибов, а также выполняют защитную и коммуникативную функцию у бактерий [10]. Сложный механизм действия, включающий воздействие на различные молекулярные мишени, в том числе на мембрану патогена, и способность быстро уничтожать клетки-мишени препятствуют формированию эффективных механизмов развития резистентности к АМП. Важно отметить, что данные соединения могут в перспективе внести вклад в борьбу с хроническими инфекциями, поскольку АМП, с одной стороны, способны уничтожать персистирующие клетки, а с другой, они обладают небольшим размером, позволяющим проникать в матрикс биопленки [11, 12].

СТРУКТУРНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ АМП

Катионные АМП, которые принято классифицировать по типу пространственной структуры, разделяют на три основных семейства. К первому относят пептиды, приобретающие преиму-

щественно α -спиральную структуру при контакте с мембранами или в средах, имитирующих свойства мембран. Во второе семейство объединяют линейные пептиды, не образующие α -спиралей и отличающиеся повышенным содержанием определенных аминокислотных остатков (Gly, Pro, His, Trp). Третье семейство составляют пептиды, в структуре которых встречаются антипараллельные β -слои. У животных АМП могут быть локализованы в барьерных эпителиальных клетках кожи и слизистых оболочек или распределяться системно благодаря биосинтезу в циркулирующих клетках (гемоциты беспозвоночных, гранулоциты позвоночных), а также участвовать в фагоцитозе [13].

Важно отметить, что нарушения в экспрессии генов АМП могут приводить к развитию хронических инфекционных и аутоиммунных заболеваний, которые могут быть связаны как с недостатком АМП (кателицидина LL-37 при нейтропении [14], α -дефенсина при болезни Крона [15]), так и с их избытком (кателицидина LL-37 при псориазе [16]) в организме, что подчеркивает ключевую роль этих соединений в регуляции иммунных процессов [17]. Катионные рибосомально синтезируемые АМП бактериального происхождения объединяют в класс бактериоцинов [18]. Активность этих соединений наиболее выражена в отношении видов бактерий, родственных продуцентам, однако известно небольшое число бактериоцинов с широким спектром активности.

Механизмы антимикробного действия бактериоцинов в настоящее время изучены недостаточно детально, хотя известно, что селективность их действия обусловлена связыванием со специфическими структурами (паттернами) на поверхности клетки-мишени (маннозофосфотрансферный комплекс, липид II и др.) [19, 20]. Молекулярный механизм антибиотического действия АМП из эукариот в большинстве случаев связан с нарушением целостности цитоплазматической мембраны патогенов, а селективность действия катионных АМП в отношении бактериальных клеток объясняется значительными различиями биохимического состава и электрофизиологических свойств мембран микроорганизмов и клеток организма-хозяина (липидный состав внешнего слоя мембраны, спонтанная кривизна поверхности мембраны, поверхностный заряд, трансмембранный потенциал и др.) [21].

Стоит отметить, что за длительную историю непрерывной коэволюции иммунной системы многоклеточных видов и патогенных бактерий последние так и не смогли отобрать и закрепить эффективные механизмы резистентности в отношении катионных АМП, поскольку они должны быть сопряжены со значительными физико-химическими изменениями в структуре клеточной

мембраны и ее электрофизиологических свойствах. Тем не менее некоторые патогенные микроорганизмы способны вырабатывать временные меры защиты для снижения чувствительности к АМП, такие как снижение отрицательного заряда на поверхности клетки путем химической модификации липополисахаридов (ЛПС), липотейховых кислот и фосфолипидов, образование биопленок и капсул, биосинтез протеаз, секреция ДНК и АМП-связывающих белков, подавление экспрессии генов, кодирующих АМП, в клетках организма-хозяина, повышение уровня биосинтеза эффлюксных насосов [22]. В отличие от многих традиционных антибиотиков, при снятии давления отбора чувствительность к АМП быстро возвращается [23], что свидетельствует о значительной нагрузке на метаболизм клетки, находящейся в состоянии повышенной устойчивости к катионным пептидам.

Наряду с обширными данными о мембранотропных свойствах АМП появляется все больше сведений о наличии дополнительных специфических мишеней (различных цитоплазматических и мембранных белков, например, шаперонов и белков Mla-пути, а также нуклеиновых кислот) для катионных пептидов [24], что дополнительно снижает риск возникновения резистентности к этим соединениям. Например, β -шпилечный АМП танатин из клопа-щитника *Podisus maculiventris* связывает белки LptA и LptD, тем самым препятствуя переносу молекул ЛПС через периплазматическое пространство и нарушая процесс биосинтеза наружной мембраны грамотрицательных бактерий [25]. Показано, что многие пролин-богатые АМП животных, проникая в рибосомный туннель, способны блокировать процесс трансляции у бактерий [26]. Выступая факторами, повышающими проницаемость бактериальных мембран, АМП могут облегчать доставку внутрь клетки антибиотиков, применяемых в клинической практике [27, 28]. Синергизм и рессенсибилизация резистентных штаммов к клинически значимым антибиотикам в присутствии АМП достигается в том числе благодаря связыванию последних с факторами резистентности, например, с металло- β -лактамазой NDM-1 [29]. Важно отметить, что для многих АМП доказано отсутствие перекрестной резистентности со стороны колистин-устойчивых штаммов бактерий, включая штаммы, которые несут плазмиду с геном *mcr-1* [30].

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ АМП, ПРОХОДЯЩИЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

На сегодняшний день охарактеризовано несколько тысяч природных АМП, обладающих как широким спектром активности, так и специфическим

действием на конкретные штаммы бактерий [31, 32]. Существующие подходы к анализу природного биоразнообразия АМП и высокопроизводительному скринингу их аналогов позволяют находить и отбирать потенциальные прототипы препаратов с требуемым профилем антимикробной активности. Тем не менее, несмотря на имеющиеся преимущества этих соединений и, зачастую, наличие эффективности в условиях *in vivo*, их выведение на рынок в качестве потенциальных антибиотиков сопряжено с рядом общих для всех АМП проблем: сравнительно высокой цитотоксичностью и острой токсичностью, низкой стабильностью и сравнительно коротким периодом полувыведения из-за протеолитической деградации и связывания с белками плазмы крови [33–36]. В большинстве случаев вышеприведенные ограничения могут быть преодолены путем рационального дизайна и модификации структуры природных соединений, в том числе создания пептидомиметиков, однако это требует дополнительных затрат на этапе разработки, получения и доклинических испытаний. Значительный прогресс в анализе взаимосвязи структуры и активности АМП, достигнутый за последние годы, хорошо освещен в ряде обзорных статей [37–40]. Не менее важный фактор – сравнительно высокая стоимость получения пептидных препаратов. За исключением цистеин-богатых АМП длиной >40 а.о. (например, дефенсинов), АМП в большинстве случаев не обладают слишком сложной пространственной структурой, поэтому могут быть синтезированы химическим путем для проведения стартовых структурно-функциональных исследований. Стоимость производства АМП оценивается в ~100–1000 долларов США за 1 мг пептида, полученного с помощью твердофазного синтеза, что намного дороже, чем производство классических антибиотиков [41, 42]. Подобные затраты снижают интерес фармацевтических компаний к проведению доклинических и клинических испытаний АМП.

В настоящее время более 60 препаратов на основе АМП проходят доклинические (~40 соединений) и клинические (~20 соединений) испытания. Стоит отметить, что среди них 16 соединений проходят различные стадии клинических испытаний как антибиотические препараты с прямым действием на клетки-мишени. Подробное описание этих АМП, а также актуальная информация о клинических исследованиях на основе баз данных Dramp Database и Clinical Trials Database, годовых отчетов, пресс-релизов, информационных сайтов компаний-разработчиков и ранее опубликованных статей [43–52] представлены в табл. 1 (структуры некоторых АМП приведены на рис. 1).

Большинство препаратов на основе АМП – природные соединения (например, кателицидин человека LL-37 или растительный дефенсин

Таблица 1. Антимикробные агенты на основе антимикробных пептидов

Наименование	Структура	Описание	Механизм действия	Применение	Фаза	Компания	Номер клинических исследований
NVB-302	Приведена на рис. 1а	Полусинтетический лантибиотик II типа, полученный из дезоксиактагардина В, продуцируемого актинобактериями <i>Actinoplanes lin-guriae</i> NCIMB41362 [53]	Ингибирование синтеза клеточной стенки за счет связывания с липидом II. Показана селективность в отношении <i>Clostridium difficile</i> [54]	Пероральная форма введения. Кишечные инфекции, вызванные <i>Clostridium difficile</i>	I*	Novacta (Welwyn Garden City, UK)	ISRCTN40071144
PAC113 (P113)	AKRHHGYKRRKFH	α-Спиральный пептид на основе фрагмента гиста-тина-5 (4–16 а.о.) из слюны человека	Связывание с поверхностным белком клеточной стенки <i>C. albicans</i> Ssa1/2p, транслокация в цитоплазму и последующее взаимодействие с калиевым транспортером Trk1p, приводящее к оттоку малых молекул и ионов [55–57]	Местное применение. Активность в отношении ряда грибов, таких как <i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> и <i>Cryptococcus neoformans</i> [56]. Оральный кандидоз	II*	Pacgen (Vancouver, BC, Canada)	NCT00659971
OP-145	IGKEFKRIVERIKRFLRELVRPLR	α-Спиральный пептид на основе LL-37 (13–36 а.о.) с несколькими аминокислотными заменами (подчеркнуты)	Разрушение мембраны. Связывание с ЛПС и липотейхоэвыми кислотами, приводящее к снижению воспалительных эффектов [58]	Местное применение. Активность в отношении <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , а также грибов <i>Candida albicans</i> и <i>Aspergillus niger</i> [58]. Инфекции среднего уха	II*	OctoPlus (Leiden, The Netherlands)	ISRCTN12149720

Таблица 1. Продолжение

Наименование	Структура	Описание	Механизм действия	Применение	Фаза	Компания	Номер клинических исследований
PL-5 (Pecleganan)	KWKSFLKTFKSA- AKTVLHTALKAISS	α -Спиральный пептид на основе синтетического пептида V681 [59]	Разрушение мембраны, однако возможно наличие внутриклеточных мишеней [60]	Местное применение. Активность в отношении <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> и <i>Acinetobacter baumannii</i> , включая мультрезистентные штаммы, а также <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> и <i>E. coli</i> [61, 62]. Раневые инфекции кожи	II	Changchun Pharmaceutical & Biotechnology Co Ltd. (Changchun/China)	Неизвестно
DPK-060 (GKN17-www)	GKHNKGKKNKG- KHNGWKWWW	Синтетический пептид, содержащий три остатка триптофана на C-концевой 17-аминокислотной эндогенной последовательности белка кининогена человека [63]	Разрушение мембраны	Местное применение. Активность в отношении штаммов <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>A. baumannii</i> [64, 65]. Инфекции при атопическом дерматите и остром наружном отите	II*	Pergamum AB (Solna, Sweden)	NCT01522391 NCT01447017
Novexatin (NP213)	(Цикло)- RRRRRRR-(цикло)	Циклический пептид, состоящий из 7 а.о. L-аргинина	Разрушение мембраны	Местное применение. Активность в отношении штаммов <i>Trichophyton rubrum</i> [66]. Грибковые инфекции ногтей (онихомикоз) [64]	II*	NovaBiotics (Aberdeen, UK)	NCT02933879 NCT02343627

Таблица 1. Продолжение

Наименование	Структура	Описание	Механизм действия	Применение	Фаза	Компания	Номер клинических исследований
LL-37 (Roroscampide)	LLGDFFRKSKEK-IGKEFKRIVQRIK-DFLRNLVPRTES	α -Спиральный пептид	Разрушение мембраны. Способность связываться с ЛПС и липотейхоевыми кислотами, приводящая к снижению воспалительных эффектов [58]	Местное применение. Широкий спектр анти-микробного действия, включая различные штаммы <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>B. subtilis</i> и <i>S. aureus</i> , в том числе метициллин-резистентный золотистый стафилококк (MRSA) [67]. Ранозаживляющая активность [68]. Хронические язвы нижних конечностей	IIb	Promore Pharma (Stockholm, Sweden)	2018-000536-10
NXP124	Приведена на рис. 1б	Растительный дефенсин с $\alpha\beta$ -структурным типом укладки, стабилизированной дисульфидными связями	Гиперполяризация митохондриальной мембраны	Местное применение. Активность в отношении штаммов <i>Candida</i> spp., <i>Styptosoccus</i> spp., дерматофитов и некоторых других грибов [48]. Грибковые инфекции ногтей (онихомикоз)	II*	Hexima (Sydney, Australia)	ACTRN126180001 31257
C16G2	TFFRLFNRSFTQ-ALGKGGGKNLRI-IRKGINIKKY	α -Спиральный синтетический пептид, представляющий собой конъюгат фрагмента белка CSPC16 для специфического связывания с поверхностью <i>S. mutans</i> и фрагмента новоспирина – АМП с широким спектром активности [69]	Специфическое связывание с поверхностью мембраны патогена с последующим ее разрушением	Местное применение. Узкий спектр действия в отношении штаммов <i>Streptococcus mutans</i> . Профилактика кариеса, вызванного данным патогеном	II*	Armata Pharmaceuticals (California, USA)	NCT03196219 NCT02044081

Таблица 1. Продолжение

Наименование	Структура	Описание	Механизм действия	Применение	Фаза	Компания	Номер клинических исследований
Lytxar (LTX-109)	Приведена на рис. 16	Синтетический катионный трипептид, состоящий из 2 а.о. аргинина, 2,5,7-три(<i>трет</i> -бутил)триптофана и этилфенильной группы [70]	Разрушение мембраны	Местное применение. Активность в отношении штаммов <i>S. aureus</i> , включая резистентные штаммы [71]. Активность в отношении дрожжей <i>S. cerevisiae</i> [72, 73]. Кожные инфекции (атопический дерматит). Импетиго/назальные инфекции, вызванные метициллин-резистентным золотистым стафилококком (MRSA). Лечение переносчиков <i>S. aureus</i>	II* I/IIa* I/IIa*	Lytx Biopharma AS/Pharma Holdings AS (Oslo, Norway)	NCT01223222 NCT01158235 NCT01803035 NCT01158235
Brilacidin (PMX-30063)	Приведена на рис. 12	Синтетический ариламидный фолдамер, имитирующий свойства дефенсинов	Деполаризация мембраны [74]	Местное применение. Широкий спектр действия, в том числе в отношении штаммов <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> и <i>Serratia marcescens</i> [75]. Острые бактериальные инфекции кожи и кожных структур, оральный мукозит	II*	PolyMedix/Cellceptix (Pennsylvania, USA)	NCT02324335 NCT01211470

Таблица 1. Продолжение

Наименование	Структура	Описание	Механизм действия	Применение	Фаза	Компания	Номер клинических исследований
Omiganan (MBI-226, MX-594AN)	ILRW ⁺ WWPWRRRK	Производное индолицина из нейтрофилов быка [76]	Деполаризация мембраны, ингибирование синтеза ДНК, РНК и белков [77]	Местное применение. Широкий спектр действия, в том числе в отношении штаммов <i>Corynebacterium</i> spp., <i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Bacillus</i> spp. [78]. Антисептик, лечение катетер-ассоциированных инфекций и розацеа	III*	Cadence Pharmaceuticals (California, USA)	NCT00231153 NCT03091426 NCT02849262 NCT02576847
Mupiravadin (POL7080)	Приведена на рис. 1d	Циклический аналог пептида 1	Связывание с белком внешней мембраны грамотрицательных бактерий LptD [79–81]	Внутривенное введение и ингаляции. Активность в отношении грамотрицательных бактерий, в том числе клинических изолятов <i>P. aeruginosa</i> , а также в отношении штаммов со множественной лекарственной устойчивостью [50, 82–84]. Внутрибольничная пневмония, вызываемая <i>P. aeruginosa</i> и <i>K. pneumoniae</i>	III*	Polyphor Ltd. (Allschwil, Switzerland)	NCT03409679
Iseganap (IB-367)	RGGLCYCRGRF-CVCVGR	β -Шпильчатый пептид, стабилизированный двумя дисульфидными связями. Аналог протегридина-1	Разрушение мембраны	Ингаляции, местное применение. Широкий спектр действия, в том числе в отношении штаммов <i>Streptococcus</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> и <i>Candida</i> spp. [85]. Пневмония/мукозит	III*	Intrabiotics Pharmaceuticals, Inc. (Mountainview, CA, USA)	NCT00022373 NCT00118781

Таблица 1. Окончание

Наименование	Структура	Описание	Механизм действия	Применение	Фаза	Компания	Номер клинических исследований
Рexiganan (MSI-78)	GIGKFLKKAKKF-GKAFVKILKK	α -Спиральный пептид на основе магейнина-2, обнаруженного в коже африканской лягушки <i>Xenopus laevis</i>	Разрушение мембраны	Местное применение. Широкий спектр действия, в том числе в отношении штаммов <i>Staphylococcus</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Corynebacterium jeikeium</i> и др. [86]. Трофические язвы при диабете	III*	Pharmaceutical Inc., впоследствии переименованная в Genaga (Plymouth Meeting, PA, USA)	NCT01590758 NCT01594762
D2A21 (Demegol)	FAKKFAKKFKK-FAKKFAKFAFAF	α -Спиральный синтетический пептид	Разрушение мембраны	Местное применение. Активность в отношении ряда штаммов грибов <i>C. albicans</i> , <i>A. niger</i> , <i>Mucor</i> spp. и <i>T. mentagrophytes</i> , а также бактериальных штаммов <i>P. aeruginosa</i> и <i>S. aureus</i> [87–89]. Ожоговые раны	III	Demegen (Philadelphia, USA)	Неизвестно

* Указанная фаза клинических исследований завершена.

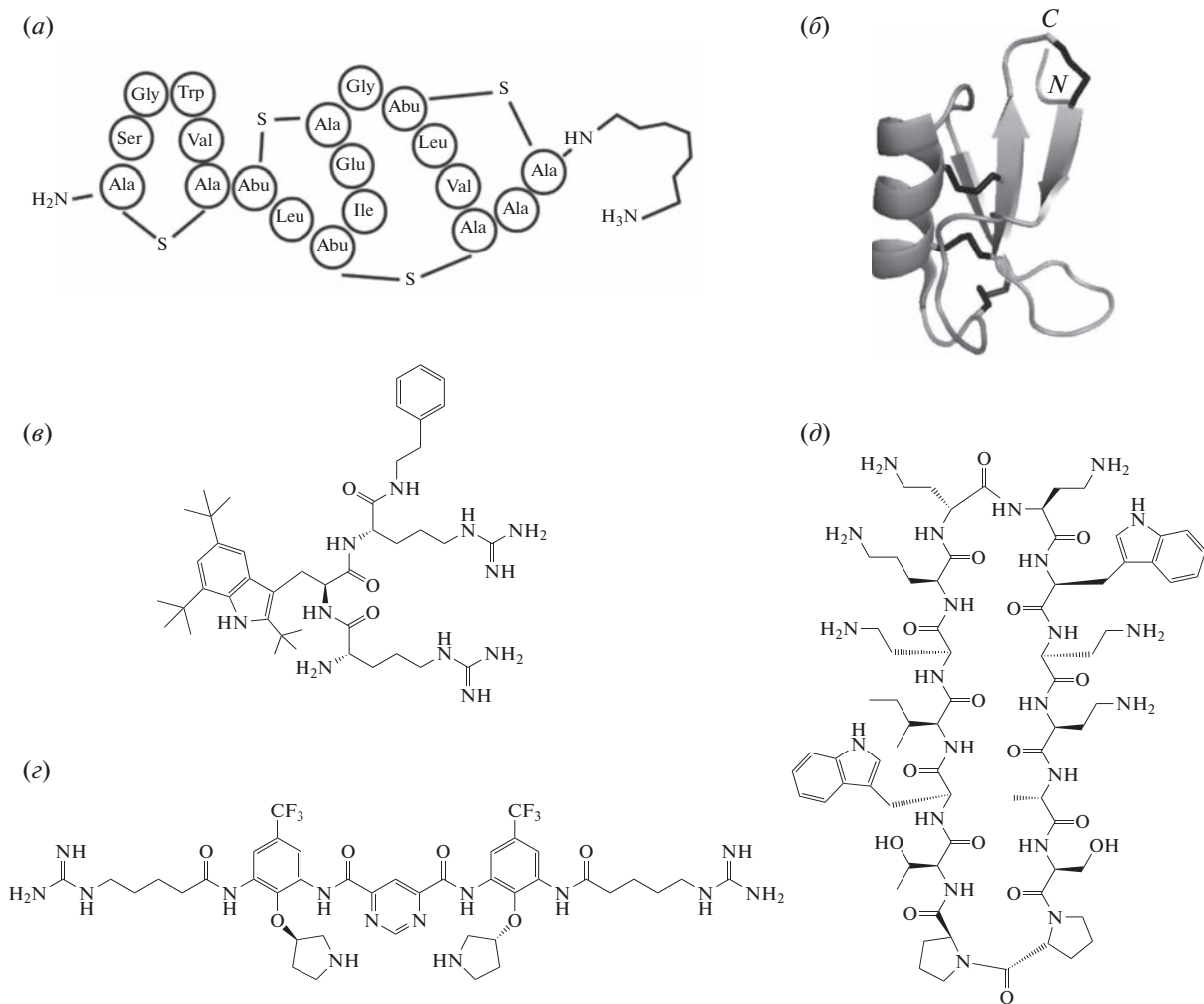


Рис. 1. Структуры антимикробных пептидов, проходящих различные стадии клинических испытаний: (а) — лантибиотик NVB-302 [79]; (б) — дефенсин NaD1 из цветка табака *Nicotiana alata* (PDB: 1MR4), который выступает структурным гомологом препарата HXP124 с аналогичным $\alpha\beta$ -типом пространственной укладки, стабилизированным четырьмя дисульфидными связями (выделены черным цветом); (в) — пептидомиметик Lytxar (LTX-109) [70]; (г) — ариламидный фолдамер Brilacidin (PMX-30063) [50]; (д) — циклический аналог протегрина-1 Murepavadin (POL7080) [80].

HXP124) или их ближайшие структурные аналоги, в частности MSI-78 (аналог магейнина), IB-367 (аналог протегрина-1), MBI-226 (аналог индолицидина). Для препаратов на основе АМП человека — производных LL-37 и гистатина — также характерно наличие иммуномодулирующей активности, что рассматривается как преимущество при лечении хронических инфекций на фоне иммунодефицита. В остальных случаях препараты позиционируются как альтернатива традиционным антибиотикам. Для большинства препаратов предполагается наружное применение в виде гелей, растворов и аэрозолей для обработки инфицированных ран (в том числе ожоговых), хронических трофических язв, а также инфекций кожи и слизистых, а их механизм действия связан с нарушением целостности и деполяризацией мембраны патогена. Исключения составляют ланти-

биотик NVB302 и циклический пептид POL7080. NVB302 представляет собой полусинтетический лантибиотик II типа, ингибирующий синтез клеточной стенки *Clostridium difficile* и ряда грамположительных бактерий, полученный на основе дезоксиактагардина В, продуцируемого актинобактериями *Actinoplanes linguriae* [53]. NVB302 успешно прошел клинические испытания фазы I для лечения диареи, вызванной *C. difficile* [90]. POL7080 (Murepavadin) представляет собой циклический аналог протегрина-1, разработанный компанией Polyphor Ltd., для лечения нозокомиальной и связанной с искусственной вентиляцией легких пневмоний (НАВР/ВАВР), вызванных *P. aeruginosa*. POL7080 специфичен в отношении данного патогена и в доклинических исследованиях превзошел эффективность колистина в отношении изолятов *P. aeruginosa* с широкой лекар-

ственной устойчивостью [50, 82–84]. POL7080 — первый антибиотик, специфически связывающийся с интегральным белком LptD внешней бактериальной мембраны, участвующий в биогенезе ЛПС синегнойной палочки [79–81].

Несмотря на возрастающую резистентность к классическим антибиотикам, стимулирующую поиск новых антибактериальных средств, существует необходимость в разработке препаратов для лечения инфекционных заболеваний, вызванных грибковыми патогенами. Наряду с антибактериальной активностью, некоторые АМП эффективны в отношении грибковых инфекций. Например, на основе АМП гистатина-5 был разработан препарат PAC113, который успешно прошел II фазу клинических испытаний в качестве средства для борьбы с грибковыми инфекциями у ВИЧ-инфицированных пациентов с кандидозом полости рта. Другими примерами противогрибковых препаратов на основе АМП служат циклический пептид NP213 (Novexatin) и растительный дефенсин HXP124 (HXP124-ONY-002, Pezadefitide) для лечения онихомикоза (грибкового поражения ногтей).

Как упоминалось ранее, восприимчивость АМП к протеолитической деградации — одна из проблем, ограничивающая разработку терапевтических средств на их основе. Однако существуют различные стратегии повышения стабильности АМП, например, введение неприродных или D-аминокислот, циклизация, химические модификации, в том числе пегилирование [91, 92]. Разнообразие структур природных АМП позволяет создавать соединения, имитирующие их структуру и активность, но с повышенной стабильностью. Примерами пептидомиметиков, проходящих клинические испытания, выступают PMX-30063 (Brilacidin) — ариламидный фолдамер, имитирующий амфифильные свойства дефенсинов, и синтетический катионный трипептид LTX-109 (Lytixar).

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ АМП В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

Динамичное распространение новых штаммов резистентных бактерий — одна из глобальных проблем общественного здравоохранения. Несмотря на то что рынок пептидных препаратов изначально был ориентирован на лечение онкологических и метаболических заболеваний, в настоящее время вектор смещается в сторону борьбы с инфекционными заболеваниями [36, 93]. Для борьбы с множественной лекарственной устойчивостью АМП рассматриваются в качестве перспективной альтернативы традиционным антибиотикам как соединения с уникальным механизмом действия. Со времени открытия низина в конце 1930-х гг. было обнаружено и исследовано

множество АМП. На сегодняшний день охарактеризовано несколько тысяч природных АМП из животных, растений и грибов, а также бактериоцинов. Более того, каждый вид многоклеточных организмов содержит гены, потенциально кодирующие АМП [94]. Почвенные и морские микробные сообщества, а также микробиота человека населены конкурирующими бактериями, что способствует синтезу и непрерывной эволюции новых АМП и, в конечном счете, приводит к возникновению арсенала антимикробных агентов с большим терапевтическим потенциалом. Несомненно, выявленное биоразнообразие природных пептидов — исключительно богатый исходный материал для разработки множества принципиально новых антибиотиков.

Очевидно, что разработанные ~60 лет назад микробиологические стандарты тестирования антибиотической активности не позволяют должным образом оценить активность АМП [95]. Внедрение модифицированных протоколов оценки антибактериальной активности АМП *in vitro*, а также исследований на небольших выборках животных позволит с большей эффективностью предсказывать терапевтический потенциал (снижение обсемененности тканей/крови или лечебный эффект) на дальнейших этапах клинических испытаний и тем самым сократить затраты на стадии скрининга представительных библиотек соединений. В отличие от традиционных низкомолекулярных антибиотиков, эндогенные АМП человека и схожие с ними по свойствам соединения белково-пептидной природы реализуют свой антимикробный потенциал, взаимодействуя с иммунной системой, например, проявляя синергизм с другими молекулами. Для эффективного скрининга АМП необходимо учитывать присутствие таких молекул, а также соответствующее физиологическое состояние патогенных клеток-мишеней, которое отличается от условий богатой ростовой среды. Кроме того, при рассмотрении нового препарата на основе АМП в качестве альтернативы классическим антибиотикам, действующим исключительно на мишень патогена, нельзя пренебрегать особенностями фармакокинетики катионных пептидов и бактериоцинов, для которых характерны связывание с белками плазмы крови и деградация под действием протеолитических ферментов.

Клинические испытания различных АМП были инициированы более 20 лет назад. Первые из них — пептиды на основе АМП животного происхождения — MSI-78 (магейнин лягушки), IB-367 (протегрин свиньи) и MBI-226 (индолицидин быка) — не показали ожидаемой эффективности в клинических испытаниях III фазы. Испытания не были успешными в основном из-за неправильного дизайна исследований, неоптимальной формы применения, в отдельных случаях из-за повы-

шенной смертности по сравнению с плацебо (например, в случае IB-367), невозможности достичь целевых показателей клинической эффективности и отсутствия улучшенных показателей активности по сравнению с классическими антибиотиками. В связи с этим критически важная задача на уровне принятия решений регулируемыми органами — повсеместное введение новых стандартов проведения клинических испытаний для АМП и других антимикробных агентов, учитывающих, в первую очередь, способность эффективно подавлять рост мультирезистентных патогенов, а также низкую вероятность и динамику развития устойчивости. Так, в 2012 г. Конгрессом США была утверждена программа “GAIN Act” (The Generating Antibiotics Incentives Now), нацеленная на решение проблемы антибиотикорезистентности путем создания антибиотиков нового поколения. В рамках программы и ряда дополнительных инициатив были запланированы следующие этапы: 1) разработка и внедрение протоколов упрощенной регистрации новых антимикробных препаратов с учетом нарастающей проблемы возникновения антибиотикорезистентности; 2) утверждение стратегии создания новых антибактериальных средств “Antibacterial Drug Development Task Force” и преобразования клинических испытаний “Clinical Trials Transformation Initiative”; 3) продление срока исключительного права (5–7 лет) и закрепление преимущества на рынке для препаратов, отнесенных Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration или FDA) к группе продуктов, соответствующих требованиям к противомикробным лекарственным средствам (Qualified Infectious Disease Products или QIDP); 4) ускоренная и упрощенная регистрация препаратов для лечения редких инфекционных заболеваний и для лечения ограниченного контингента пациентов (программа “Limited-Population Antibacterial Drug (LPAD) Pathway”). Во многом благодаря вышеописанным регуляторным инициативам все больше новых АМП на этапе доклинических испытаний позиционируются как препараты системного действия для борьбы с мультирезистентными ESKAPE-патогенами, т.е. как альтернатива классическим антибиотикам [96, 97]. Наличие отличного от классических антибиотиков механизма действия АМП также создает перспективу их совместного применения благодаря выраженному синергизму по отношению к бактериям при одновременном введении [98].

Фармацевтические компании зачастую сосредоточены на разработке лекарственных препаратов на основе АМП для местного применения как более безопасных и экономичных вариантов антимикробных агентов. Разработка оптимальных рецептур и способов введения препаратов-кандидатов на основе АМП остается одной из основ-

ных стратегических задач для их успешного практического использования. Кроме того, рядом компаний ведутся разработки по созданию на основе АМП покрытий для обработки изделий медицинского назначения (имплантатов, катетеров, хирургических инструментов). Наконец, повышению темпов внедрения препаратов на основе АМП в медицинскую практику может способствовать разработка современных биотехнологических подходов и универсальных платформ для масштабирования технологических процессов получения АМП с различной структурой [42]. Значительное снижение стоимости производства АМП будет стимулировать переход от фундаментальных исследований к доклиническим испытаниям со стороны научного сообщества, а также интерес фармацевтических компаний к проведению клинических испытаний наиболее перспективных соединений. По оценке ряда ведущих мировых ученых в области разработки антимикробных препаратов, для успешного прохождения III фазы клинических исследований с последующей регистрацией хотя бы одного препарата на основе АМП необходимо создать непрерывный процесс испытаний (“pipeline”) как минимум 34 различных соединений, начиная от этапа доклинических исследований, с суммарными инвестициями не менее 600 млн фунтов стерлингов [99]. Учитывая динамичное развитие данного направления, нет сомнений, что в течение ближайшего десятилетия первые противомикробные агенты на основе АМП будут активно использоваться в мировой медицинской практике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В эпоху стремительного распространения резистентных штаммов бактерий наряду с поиском новых антибактериальных агентов возникает необходимость в разработке соединений для борьбы с грибковыми патогенами и микроорганизмами, формирующими биопленки. В настоящее время все чаще появляются сообщения о резистентности патогенов к полимиксинам, что ставит под сомнение перспективы эффективного применения этих антибиотиков в качестве “последней линии” противомикробной защиты. Это особенно актуально на фоне активного плазмидо-опосредованного распространения генов *mcr-1*, обуславливающих устойчивость к данным антибиотикам [100]. Результаты клинических исследований подтверждают терапевтический потенциал препаратов на основе АМП в качестве средств многоцелевого назначения для лечения бактериальных и грибковых инфекционных заболеваний и удаления биопленок. Несмотря на ряд проблем, ограничивающих выведение АМП на рынок в качестве лекарственных препаратов, в настоящее время активно разрабатываются раз-

личные стратегии преодоления этих проблем, включая снижение токсических эффектов, производственных затрат и улучшения фармакокинетических параметров. Кроме того, существует возможность регуляции биосинтеза эндогенных АМП человека, в частности при действии различных модуляторов, например, витамина D3 [101]. Ряд преимуществ АМП (низкая вероятность развития резистентности, быстрота действия, наличие внутриклеточных мишеней, широкий спектр антимикробного действия, различные виды биологической активности, синергизм действия с конвенциональными антибиотиками) открывает реальную возможность преодоления распространения резистентных патогенных штаммов микроорганизмов. Лекарственные препараты на основе АМП следует рассматривать в качестве резервных антибиотических средств при развитии у пациентов тяжелых состояний, вызванных госпитальными инфекциями, опосредованными штаммами грамотрицательных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 22-25-00496).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Т.В. Овчинникова и П.В. Пантелеев сформулировали концепцию обзора, В.Н. Сафронова, И.А. Болозов, П.В. Пантелеев и С.В. Баландин собрали и проанализировали литературные данные, а также подготовили начальную версию обзора. С.В. Баландин обеспечил финансирование работ. Т.В. Овчинникова проанализировала собранные литературные данные, осуществила редактирование и подготовила рукопись к публикации. Окончательный вариант обзора был утвержден всеми авторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ventola C.L. // P T. 2015. V. 40. P. 277–283.
2. Ma Y., Wang C., Li Y., Li J., Wan Q., Chen J., Tay F.R., Niu L. // Adv. Sci. 2020. V. 7. P. 1901872. <https://doi.org/10.1002/advs.201901872>
3. Lewis K. // Nat. Rev. Drug Dis. 2013. V. 12. P. 371–387. <https://doi.org/10.1038/nrd3975>
4. Lloyd D.H. // Vet. Dermatol. 2012. V. 23. P. 299–e60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01042.x>
5. Munguia J., Nizet V. // Trend. Pharmacol. Sci. 2017. V. 38. P. 473–488. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.02.003>
6. Johnson B.K., Abramovitch R.B. // Trend. Pharmacol. Sci. 2017. V. 38. P. 339–362. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.01.004>
7. Ventola C.L. // P T. 2015. V. 40. P. 344–352.
8. Yeung A.T.Y., Gellatly S.L., Hancock R.E.W. // Cell. Mol. Life Sci. 2011. V. 68. P. 2161–2176. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0710-x>
9. Peters B.M., Shirliff M.E., Jabra-Rizk M.A. // PLoS Pathog. 2010. V. 6. P. e1001067. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001067>
10. Zasloff M. // Nature. 2002. V. 415. P. 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>
11. de la Fuente-Núñez C., Cardoso M.H., de Souza Cândido E., Franco O.L., Hancock R.E.W. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1858. P. 1061–1069. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.12.015>
12. Batoni G., Maisetta G., Brancatisano F.L., Esin S., Campa M. // Curr. Med. Chem. 2011. V. 18. P. 256–279. <https://doi.org/10.2174/092986711794088399>
13. Lai Y., Gallo R.L. // Trend. Immunol. 2009. V. 30. P. 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.12.003>
14. Pütsep K., Carlsson G., Boman H.G., Andersson M. // Lancet. 2002. V. 360. P. 1144–1149. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11201-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11201-3)
15. Wehkamp J., Salzman N.H., Porter E., Nuding S., Weichenthal M., Petras R.E., Shen B., Schaeffeler E., Schwab M., Linzmeier R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 18129–18134. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505256102>
16. Lande R., Gregorio J., Facchinetti V., Chatterjee B., Wang Y.-H., Homey B., Cao W., Wang Y.-H., Su B., Nestle F.O. // Nature. 2007. V. 449. P. 564–569. <https://doi.org/10.1038/nature06116>
17. Hancock R.E.W., Haney E.F., Gill E.E. // Nat. Rev. Immunol. 2016. V. 16. P. 321–334. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.29>
18. Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. // Nat. Rev. Microbiol. 2013. V. 11. P. 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
19. Ríos Colombo N.S., Chalón M.C., Navarro S.A., Bello-mio A. // Curr. Genet. 2018. V. 64. P. 345–351. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0757-9>
20. Chikindas M.L., Weeks R., Drider D., Chistyakov V.A., Dicks L.M. // Curr. Opin. Biotechnol. 2018. V. 49. P. 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011>
21. Teixeira V., Feio M.J., Bastos M. // Prog. Lipid Res. 2012. V. 51. P. 149–177. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>

22. Joo H.-S., Fu C.-I., Otto M. // *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2016. V. 371. P. 20150292. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0292>
23. Habets M.G.J.L., Brockhurst M.A. // *Biol. Lett.* 2012. V. 8. P. 416–418. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.1203>
24. Le C.-F., Fang C.-M., Sekaran S.D. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017. V. 61. P. e02340–16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02340-16>
25. Vetterli S.U., Zerbe K., Müller M., Urfer M., Mondal M., Wang S.-Y., Moehle K., Zerbe O., Vitale A., Pessi G. // *Sci. Adv.* 2018. V. 4. P. eaau2634. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau2634>
26. Seefeldt A.C., Graf M., Pérébasquine N., Nguyen F., Arenz S., Mardirossian M., Scocchi M., Wilson D.N., Innis C.A. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. P. 2429–2438. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1545>
27. Cassone M., Otvos L. // *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2010. V. 8. P. 703–716. <https://doi.org/10.1586/eri.10.38>
28. Zharkova M.S., Orlov D.S., Golubeva O.Yu., Chakchir O.B., Eliseev I.E., Grinchuk T.M., Shamova O.V. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019. V. 9. P. 128. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00128>
29. Ma B., Fang C., Lu L., Wang M., Xue X., Zhou Y., Li M., Hu Y., Luo X., Hou Z. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 3517. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11503-3>
30. Dobias J., Poiriel L., Nordmann P. // *Clin. Microbiol. Infect.* 2017. V. 23. P. 676.e1–676.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.015>
31. Theuretzbacher U., Outtersen K., Engel A., Karlén A. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2020. V. 18. P. 275–285. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0288-0>
32. Andersson D.I., Hughes D., Kubicek-Sutherland J.Z. // *Drug Resist. Updat.* 2016. V. 26. P. 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.04.002>
33. Mahlapuu M., Håkansson J., Ringstad L., Björn C. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2016. V. 6. P. 194. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
34. Atefyekta S., Blomstrand E., Rajasekharan A.K., Svensson S., Trobos M., Hong J., Webster T.J., Thomsen P., Andersson M. // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2021. V. 7. P. 1693–1702. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00029>
35. Luong H.X., Thanh T.T., Tran T.H. // *Life Sci.* 2020. V. 260. P. 118407. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118407>
36. Fosgerau K., Hoffmann T. // *Drug Dis. Today.* 2015. V. 20. P. 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>
37. Greco I., Molchanova N., Holmedal E., Jenssen H., Hummel B.D., Watts J.L., Håkansson J., Hansen P.R., Svensson J. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 13206. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69995-9>
38. Ahmed T.A.E., Hammami R. // *J. Food Biochem.* 2019. V. 43. P. e12546. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12546>
39. Edwards I.A., Elliott A.G., Kavanagh A.M., Zuegg J., Blaskovich M.A.T., Cooper M.A. // *ACS Infect. Dis.* 2016. V. 2. P. 442–450. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00045>
40. Schmitt P., Rosa R.D., Destoumieux-Garzón D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1858. P. 958–970. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.011>
41. Marr A., Gooderham W., Hancock R. // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2006. V. 6. P. 468–472. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>
42. Cao J., de la Fuente-Nunez C., Ou R.W., Torres M.D.T., Pande S.G., Sinskey A.J., Lu T.K. // *ACS Synth. Biol.* 2018. V. 7. P. 896–902. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00396>
43. Dijksteelt G.S., Ulrich M.M.W., Middelkoop E., Boekema B.K.H.L. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. P. 616979. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.616979>
44. Divyashree M., Mani M.K., Reddy D., Kumavath R., Ghosh P., Azevedo V., Barh D. // *Protein Pept. Lett.* 2020. V. 27. P. 120–134. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190925152957>
45. Browne K., Chakraborty S., Chen R., Willcox M.D., Black D.S., Walsh W.R., Kumar N. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 7047. <https://doi.org/10.3390/ijms21197047>
46. Magana M., Pushpanathan M., Santos A.L., Leanse L., Fernandez M., Ioannidis A., Giulianotti M.A., Apidianakis Y., Bradfute S., Ferguson A.L. // *Lancet Infect. Dis.* 2020. V. 20. P. e216–e230. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30327-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30327-3)
47. Erdem Büyükkiraz M., Kesmen Z. // *J. Appl. Microbiol.* 2022. V. 132. P. 1573–1596. <https://doi.org/10.1111/jam.15314>
48. Mercer D.K., O'Neil D.A. // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. P. 2177. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02177>
49. Mookherjee N., Anderson M.A., Haagsman H.P., Davidson D.J. // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2020. V. 19. P. 311–332. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0058-8>
50. Jiang Y., Chen Y., Song Z., Tan Z., Cheng J. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021. V. 170. P. 261–280. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.016>
51. Lesiuk M., Paduszyńska M., Greber K.E. // *Antibiotics.* 2022. V. 11. P. 1062. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081062>
52. Moretta A., Scieuzo C., Petrone A.M., Salvia R., Maniello M.D., Franco A., Lucchetti D., Vassallo A., Vogel H., Sgambato A. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021. V. 11. P. 668632. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.668632>
53. Boakes S., Appleyard A.N., Cortés J., Dawson M.J. // *J. Antibiot. (Tokyo).* 2010. V. 63. P. 351–358. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.48>
54. Crowther G.S., Baines S.D., Todhunter S.L., Freeman J., Chilton C.H., Wilcox M.H. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2013. V. 68. P. 168–176. <https://doi.org/10.1093/jac/dks359>
55. Li X.S., Reddy M.S., Baev D., Edgerton M. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 28553–28561. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300680200>

56. 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>
57. 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>
58. Nell M.J., Tjabringa G.S., Wafelman A.R., Verrijck R., Hiemstra P.S., Drijfhout J.W., Grote J.J. // *Peptides.* 2006. V. 27. P. 649–660. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.09.016>
59. Chen Y., Mant C.T., Farmer S.W., Hancock R.E.W., Vasil M.L., Hodges R.S. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 12316–12329. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413406200>
60. Zhang L., Benz R., Hancock R.E. // *Biochemistry.* 1999. V. 38. P. 8102–8111. <https://doi.org/10.1021/bi9904104>
61. AB Naafs M. // *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* 2018. V. 7. P. 6038–6042. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2018.07.001536>
62. Wei Y., Wu J., Chen Y., Fan K., Yu X., Li X., Zhao Y., Li Y., Lv G., Song G. // *Ann. Surg.* 2022. V. 277(1). P. 43–49. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000005508>
63. Schmidtchen A., Pasupuleti M., Mörgelin M., Davoudi M., Alenfall J., Chalupka A., Malmsten M. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 17584–17594. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.011650>
64. Boge L., Umerska A., Matougui N., Bysell H., Ringstad L., Davoudi M., Eriksson J., Edwards K., Andersson M. // *Int. J. Pharm.* 2017. V. 526. P. 400–412. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.082>
65. Nordström R., Nyström L., Andrén O.C.J., Malkoch M., Umerska A., Davoudi M., Schmidtchen A., Malmsten M. // *J. Colloid Interface Sci.* 2018. V. 513. P. 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.11.014>
66. Mercer D.K., Stewart C.S., Miller L., Robertson J., Duncan V.M.S., O'Neil D.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019. V. 63. P. e02117–18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02117-18>
67. Turner J., Cho Y., Dinh N.-N., Waring A.J., Lehrer R.I. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998. V. 42. P. 2206–2214.
68. Kos S., Vanvarenberg K., Dolinsek T., Cemazar M., Jelenc J., Préat V., Sersa G., Vandermeulen G. // *Bioelectrochemistry.* 2017. V. 114. P. 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.12.002>
69. Kowalski R.P., Romanowski E.G., Yates K.A., Mah F.S. // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2016. V. 32. P. 23–27. <https://doi.org/10.1089/jop.2015.0098>
70. Isaksson J., Brandsdal B.O., Engqvist M., Flaten G.E., Svendsen J.S.M., Stensen W. // *J. Med. Chem.* 2011. V. 54. P. 5786–5795. <https://doi.org/10.1021/jm200450h>
71. Saravolatz L.D., Pawlak J., Johnson L., Bonilla H., Saravolatz L.D., Fakih M.G., Fugelli A., Olsen W.M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. V. 56. P. 4478–4482. <https://doi.org/10.1128/AAC.00194-12>
72. Saravolatz L.D., Pawlak J., Martin H., Saravolatz S., Johnson L., Wold H., Husbyn M., Olsen W.M. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2017. V. 65. P. 410–413. <https://doi.org/10.1111/lam.12792>
73. Bojsen R., Torbensen R., Larsen C.E., Folkesson A., Regenberg B. // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. e69483. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069483>
74. Tew G.N., Liu D., Chen B., Doerksen R.J., Kaplan J., Carroll P.J., Klein M.L., DeGrado W.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 5110–5114. <https://doi.org/10.1073/pnas.082046199>
75. Kaplan C.W., Sim J.H., Shah K.R., Kolesnikova-Kaplan A., Shi W., Eckert R. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011. V. 55. P. 3446–3452. <https://doi.org/10.1128/AAC.00342-11>
76. Melo M., Dugourd D., Castanho M. // *Recent Patents Anti-Infect. Drug Discov.* 2006. V. 1. P. 201–207. <https://doi.org/10.2174/15748910677452638>
77. Lorenzi T., Trombettoni M.M.C., Ghiselli R., Paolinelli F., Gesuita R., Cirioni O., Provinciali M., Kamysz W., Kamysz E., Piangatelli C. // *Am. J. Transl. Res.* 2017. V. 9. P. 3374–3386.
78. Sader H.S., Fedler K.A., Rennie R.P., Stevens S., Jones R.N. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004. V. 48. P. 3112–3118. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3112-3118.2004>
79. Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. // *J. Antibiot.* 2013. V. 66. P. 571–591. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.86>
80. Martin-Loeches I., Dale G.E., Torres A. // *Exp. Rev. Anti-Infect. Ther.* 2018. V. 16. P. 259–268. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1441024>
81. Srinivas N., Jetter P., Ueberbacher B.J., Werneburg M., Zerbe K., Steinmann J., Van der Meijden B., Bernardini F., Lederer A., Dias R.L.A. // *Science.* 2010. V. 327. P. 1010–1013. <https://doi.org/10.1126/science.1182749>
82. Kong Q., Yang Y. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2021. V. 35. P. 127799. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.127799>
83. Sader H.S., Dale G.E., Rhomberg P.R., Flamm R.K. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018. V. 62. P. e00311–18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00311-18>
84. Sader H.S., Flamm R.K., Dale G.E., Rhomberg P.R., Castanheira M. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2018. V. 73. P. 2400–2404. <https://doi.org/10.1093/jac/dky227>
85. Giles F.J., Redman R., Yazji S., Bellm L. // *Exp. Opin. Invest. Drugs.* 2002. V. 11. P. 1161–1170. <https://doi.org/10.1517/13543784.11.8.1161>
86. Gottler L.M., Ramamoorthy A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1788. P. 1680–1686. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.009>
87. Chalekson C.P., Neumeister M.W., Jaynes J. // *J. Trauma.* 2003. V. 54. P. 770–774. <https://doi.org/10.1097/01.TA.0000047047.79701.6D>
88. Ballweber L.M., Jaynes J.E., Stamm W.E., Lampe M.F. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. P. 34–41. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.1.34-41.2002>
89. Chalekson C.P., Neumeister M.W., Jaynes J. // *Plast. Reconstr. Surg.* 2002. V. 109. P. 1338–1343. <https://doi.org/10.1097/00006534-200204010-00020>

90. Sandiford S.K. // *Exp. Opin. Drug Dis.* 2019. V. 14. P. 71–79.
<https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1549032>
91. de la Fuente-Núñez C., Refluveille F., Mansour S.C., Reckseidler-Zenteno S.L., Hernández D., Brackman G., Coenye T., Hancock R.E.W. // *Chem. Biol.* 2015. V. 22. P. 196–205.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.01.002>
92. Han Y., Zhang M., Lai R., Zhang Z. // *Peptides*. 2021. V. 146. P. 170666.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170666>
93. Henninot A., Collins J.C., Nuss J.M. // *J. Med. Chem.* 2018. V. 61. P. 1382–1414.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00318>
94. Lazzaro B.P., Zasloff M., Rolff J. // *Science*. 2020. V. 368. P. eaau5480.
<https://doi.org/10.1126/science.aau5480>
95. Mercer D.K., Torres M.D.T., Duay S.S., Lovie E., Simpson L., von Köckritz-Blickwede M., de la Fuente-Núñez C., O'Neil D.A., Angeles-Boza A.M. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020. V. 10. P. 326.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00326>
96. Murugaiyan J., Kumar P.A., Rao G.S., Iskandar K., Hawser S., Hays J.P., Mohsen Y., Adukkadukkam S., Awuah W.A., Jose R.A.M. // *Antibiotics*. 2022. V. 11. P. 200.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics11020200>
97. Gan B.H., Gaynord J., Rowe S.M., Deingruber T., Spring D.R. // *Chem. Soc. Rev.* 2021. V. 50. P. 7820–7880.
<https://doi.org/10.1039/D0CS00729C>
98. Duong L., Gross S.P., Siryaporn A. // *Front. Med. Technol.* 2021. V. 3. P. 640981.
<https://doi.org/10.3389/fmedt.2021.640981>
99. Czaplewski L., Bax R., Clokie M., Dawson M., Fairhead H., Fischetti V.A., Foster S., Gilmore B.F., Hancock R.E.W., Harper D. // *Lancet Infect. Dis.* 2016. V. 16. P. 239–251.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00466-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00466-1)
100. Nang S.C., Li J., Velkov T. // *Crit. Rev. Microbiol.* 2019. V. 45. P. 131–161.
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1492902>
101. Han J.E., Alvarez J.A., Jones J.L., Tangpricha V., Brown M.A., Hao L., Brown L.A.S., Martin G.S., Ziegler T.R. // *Nutrition*. 2017. V. 38. P. 102–108.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.02.002>

Therapeutic Potential and Application Prospects of Antimicrobial Peptides in the Era of Global Spread of Antibiotic Resistance

V. N. Safronova*, I. A. Bolosov*, P. V. Panteleev*, S. V. Balandin*, #, and T. V. Ovchinnikova*

E-mail: arenicin@mail.ru

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

In the era of the growing global threat of antibiotic resistance, antimicrobial peptides (AMPs) are considered as new generation drugs for treatment of various infectious diseases. In this review, AMPs are seen as an alternative to traditional antibiotics, many of which have already lost or are gradually reducing their effectiveness against a number of critically important pathogenic microorganisms. Recent outbreaks of secondary infections during the COVID-19 pandemic have increased the interest in AMPs due to an acute shortage of effective agents against bacterial and fungal infections. The review summarized current data on clinical studies of AMPs, assembled a list of developed drugs based on AMPs at various stages of clinical trials, highlighted the urgency of study of new AMPs, and systematized the most relevant clinical data and application of AMPs.

Keywords: antimicrobial peptides (AMPs), infectious diseases, antibiotic resistance, multidrug resistance, peptide therapeutics, clinical trials



МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ И ИХ РОЛЬ В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК¹

© 2023 г. Д. А. Коршунов*, #, Е. Е. Середа*, **, И. В. Кондакова*

*Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского
медицинского центра РАН, Россия, 634009 Томск, пер. Кооперативный, 5

**Сибирский государственный медицинский университет, Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2

Поступила в редакцию 13.11.2022 г.

После доработки 19.11.2022 г.

Принята к публикации 20.11.2022 г.

Функция нового открытого белка часто оценивается путем сопоставления его последовательности с последовательностями белков с известными функциями. Однако белковые суперсемейства могут содержать в себе гомологичные элементы, которые при этом катализируют разные реакции. Некоторые гомологичные белки отличаются тем, что выполняют вторую или даже третью функцию и именуются “moonlighting proteins”, что можно перевести как белки-совместители или белки подрабтки. В последнее время такие белки стали называть многофункциональными. Помимо них в суперсемейства белков с несколькими функциями включают псевдоферменты, имеющие обычный каталитически активный домен, но не обладающие каталитической активностью, а также метаморфы и морфеины. В обзоре приводятся примеры таких белков, обсуждается многообразие их функций и значимость в жизнедеятельности клеток.

Ключевые слова: многофункциональные белки, GAPDH, псевдоферменты, метаморфы, морфеины

DOI: 10.31857/S0132342323030144, **EDN:** PDRGXM

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	259
ПРИМЕРЫ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ.....	260
ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТ- ДЕГИДРОГЕНАЗА.....	262
Функциональное разнообразие GAPDH.....	262
Фосфорилирование GAPDH.....	262
Нитрозилирование GAPDH.....	263
Участие GAPDH в метаболизме гема.....	263
Апоптотическая и другие роли SNO-GAPDH.....	263
Модификация GAPDH N-ацетилглюкозамином.....	265

МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ.....	266
ПСЕВДОФЕРМЕНТЫ.....	267
МЕТАМОРФЫ И МОРФЕИНЫ.....	268
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	269
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	269

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные исследования продемонстрировали, что отдельные белки могут работать “по совместительству” — это означает, что они могут выполнять множество функций в зависимости от локализации в клетке, экспрессии в различных типах клеток, взаимодействия с другими белками с образованием мультимеров и иных механизмов.

В 1982 г. T. Ingolia и E. Craig сообщили об определении первичной последовательности ДНК четырех белков теплового шока (*hsp22*, *hsp23*, *hsp26* и *hsp27*) у дрозофилы [1]. Когда эти последовательности белков теплового шока сравнили с последовательностями других известных белков, авторы обнаружили, что они гомологичны α -кристаллину млекопитающих — белку, который составляет 35% хрусталика глаза позвоночных [1]. Белок α -кристаллин несет в себе структурную

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: AMF — аутокринный фактор подвижности; DLA2 — дигидролипоилтрансацилаза из хлоропластов *Chlamydomonas reinhardtii*; GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; GOSPEL — конкурент GAPDH с белком Siah (GAPDH's competitor Of Siah Protein Enhances Life); iNOS — индуцибельная синтаза оксида азота; LA — α -лактальбумин; Ltn — хемокин-лимфотактин семейства C; mHtt — мутантная форма белка гентингина; PDC — пируватдегидрогеназа; SNO-GAPDH — модификация GAPDH оксидом азота в активном центре цистеина; Sirt1 — сиртуин-1; РБЖ — регуляторные белки железа; ЭРЖ — элементы, реагирующие на железо.

Автор для связи: (тел.: +7 (3822) 28-26-76, доб. 3341; эл. почта: ievved@ya.ru).

функцию, которая заключается в содействии поддержанию надлежащего показателя преломления в хрусталике. В дальнейшем было показано, что α -кристаллин экспрессируется в других тканях помимо хрусталика [2–5]. Более того, α -кристаллин, выделенный из глаз млекопитающих, обладал шаперонной активностью *in vitro*, указывая на то, что в тканях хрусталика сохранялась эта активность. Вскоре было обнаружено, что другие кристаллины, специфичные для птиц и рептилий, имеют очень высокое сходство последовательностей с метаболическими ферментами, проявляют эти метаболические ферментативные активности при выделении из ткани хрусталика и кодируются тем же геном [6, 7]. Очевидный и неожиданный вывод заключался в том, что некоторые кристаллины, кодируемые одним и тем же геном, могут выполнять две совершенно разные функции.

В 1988 г. J. Piatigorsky и его коллеги впервые описали явление, при котором белок, кодируемый одним геном, выполняет две или более несвязанные функции в клетке или организме [6, 8]. В 1999 г. С. Jeffrey использовала термин “moonlighting proteins”, чтобы лучше описать эти белки, выполняющие несколько функций в клетке или организме [9]. На нынешнем этапе исследования таких белков стало понятным, что они имеют широкое распространение, обеспечивая молекулярные связи между биологическими процессами, которые кажутся совершенно разными.

Многие белки, совмещающие свои функции, выступают ферментами, рецепторами, ионными каналами или шаперонами. Наиболее распространенная основная функция многофункциональных белков — ферментативный катализ, но эти ферменты приобрели вторичные некаталитические роли. Некоторые примеры многофункциональности белков, вторичных по отношению к катализу, включают передачу сигнала, регуляцию транскрипции, апоптоза, подвижности и структурную функцию [10]. При этом проявление различных свойств таких белков может быть связано с их посттрансляционной модификацией, образованием нового комплекса с другим белком или с функционированием в неизменном нативном виде, но в новой роли.

ПРИМЕРЫ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Белки, имеющие множество функций, были обнаружены в различных организмах, включая бактерии, дрожжи, растения и позвоночных [11].

Метаболические ферменты часто совмещают первоначально выявленную функцию с передачей сигналов или регуляцией, например, транскрипции или трансляции. В качестве примера

можно привести аконитазу из *Mycobacterium tuberculosis* [12–14]. Аконитазы — железосерные белки, кластеры которых не только участвуют в транспорте электронов при обратимой изомеризации цитрата и изоцитрата в цикле лимонной кислоты [15], но также служат сенсорами железа и кислорода в клетке [16, 17]. Бинарная активность проявляется посредством сборки и разборки кластеров железа и серы. Белок с интактным кластером 4Fe-4S функционирует как аконитаза, тогда как белок с 3Fe-4S — РНК-связывающий регулятор трансляции [18, 19]. На стабильность и функциональную активность аконитазы как регулятора трансляции влияет не только уровень железа, но и окислительный стресс, который побуждает эти регуляторные белки железа (РБЖ) связываться с элементами, реагирующими на железо (ЭРЖ), и поддерживать гомеостаз железа [20] путем посттранскрипционного связывания с консервативными РНК-структурами “стебель–петля” или ЭРЖ, присутствующими либо на 5'-, либо на 3'-концах нетранслируемых областей мРНК (рис. 1). В зависимости от того, находится ЭРЖ на 3'- или 5'-конце, связывание РБЖ с ЭРЖ либо защищает мРНК от деградации, либо ингибирует ее трансляцию [21, 22].

Другой пример многофункционального белка, связывающего два родственных пути, — дигидролипидилтрансфераза (DLA2) из хлоропластов *Chlamydomonas reinhardtii* [23, 24]. Этот белок — часть пируватдегидрогеназного комплекса (PDC), превращающий пирuvat в ацетил-КоА [23, 25]. Ацетил-КоА далее превращается в малонил-КоА и используется для синтеза тилакоидной мембраны [26, 27]. Если ацетил-КоА синтезируется непосредственно из ацетата, DLA2 может покинуть PDC и взаимодействовать с мРНК, тем самым активируя трансляцию субъединицы D1 фотосистемы II, которая встраивается во вновь синтезированные мембраны. Таким образом, DLA2 связывает метаболический путь с регуляцией трансляции [23, 25]. Также в гликолизе были обнаружены многофункциональные белки, по-видимому, связывающие метаболизм с передачей сигналов. Гексокиназа — фермент, ответственный за удержание глюкозы в клетке путем превращения глюкозы в глюкозо-6-фосфат [28]. У дрожжей обнаружено, что этот фермент, помимо своей основной функции, взаимодействует с транскрипционным фактором Mig1 и ингибирует экспрессию генов, участвующих в углеводном обмене [29, 30].

Многофункциональные белки могут выполнять разные задачи не только внутри клетки, но и внеклеточно. Примером может быть фосфоглюкоизомераза — еще один фермент, участвующий в гликолизе и катализирующий реакцию превращения глюкозо-6-фосфата в фруктозо-6-фосфат. Этот фермент также выполняет вторич-

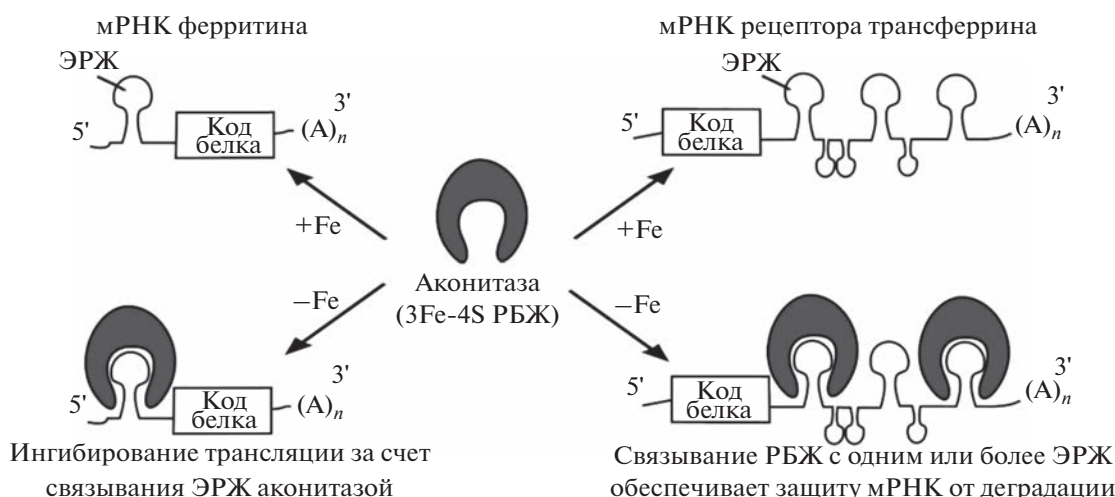


Рис. 1. Регуляция трансляции ферритина и рецептора трансферрина. Аконитаза в роли регулятора белков железа (РБЖ) связывается с элементами, реагирующими на железо (ЭРЖ). При снижении уровня железа РБЖ связывается с ЭРЖ на 5' конце мРНК ферритина, выполняющего роль основного внутриклеточного депо железа. В этом случае блокируется трансляция ферритина. Для увеличения возникшего дефицита железа РБЖ связывается с ЭРЖ на 3' концах нетранслируемых областей мРНК рецептора трансферрина, что защищает мРНК от деградации. Дизайн рисунка по данным Beinert et al. [13].

ные функции при его секреции из клетки. Было установлено, что последовательность кДНК фосфоглюкозоизомеразы мыши полностью идентична последовательности кДНК нейрорейкина мыши [31, 32]. Последний изначально был обнаружен в скелетных мышцах, головном мозге, сердце и почках и известен своей поддерживающей функцией выживания эмбриональных, спинномозговых, скелетных двигательных и сенсорных нейронов. Обширные биохимические и структурные исследования фосфоглюкозоизомеразы установили, что она регулирует различные виды внеклеточной активности и в результате этого имеет много названий, в том числе аутокринный фактор подвижности (AMF) и фактор созревания [33, 34]. Фосфоглюкозоизомераза/AMF занимает особое место в онкогенезе, т.к. играет роль цитокина, который регулирует подвижность опухолевых клеток и является их маркером [35].

Распространенный фактор переключения функций белков подработки — стрессы окружающей среды. Например, пероксиредоксины в нормальных условиях представляют собой семейство пероксидаз, которые структурно — мономеры и поддерживают гомеостаз тиолов, катализируя восстановление органических гидропероксидов, H_2O_2 и пероксинитрита. Однако в условиях окислительного стресса или теплового шока пероксиредоксин претерпевает переход в более высокомолекулярный гомоолигомерный комплекс, состоящий из пяти димеров, связанных гидрофобными взаимодействиями [36]. Это приводит к изменению восстановительной функции у пероксидазы на шаперонную, заключающуюся в укладке, сворачива-

нии и стабилизации белков, разрушенных в условиях клеточного стресса [37].

Другой пример — протеаза DegP, также имеющая температурно-зависимое изменение функции, когда она становится молекулярным шапероном. В условиях низких температур (25°C) DegP функционирует как молекулярный шаперон с инактивированным протеолитическим сайтом. При повышении температуры до 37°C и выше протеолитический сайт активируется за счет изменения конформации белка, и в результате DegP может катализировать деградацию белка (рис. 2) [38, 39].

Необходимо отметить, что примеры многофункциональных белков и механизмов их действия весьма многочисленны, но для раскрытия вопроса функций совмещения достаточно рассмотреть глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, хорошо известный белок гликолиза.

ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗА

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH, КФ 1.2.1.12) можно назвать классическим представителем многофункциональных белков. GAPDH хорошо известна своей ролью во время гликолиза для производства энергии в клетке — фермент катализирует превращение глицеральдегид-3-фосфата в D-глицерат-1,3-бисфосфат с одновременным образованием NADH. GAPDH долгое время считалась лишь классическим белком домашнего хозяйства, не представляющим особого интереса, за исключением роли в производстве энергии.

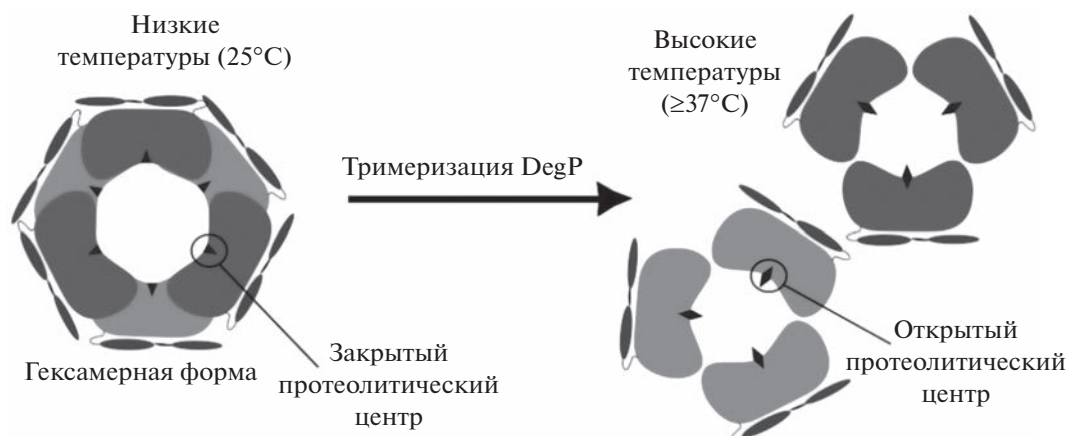


Рис. 2. Температурно-зависимое изменение функции протеазы DegP. Дизайн рисунка по данным Šulskis et al. [39].

GAPDH кодируется одним структурным геном *GAPD* [40, 41] с образованием одной мРНК при транскрипции и отсутствием альтернативных транскриптов [42], ее молекулярная масса составляет 37 кДа [43]. Олигомеры GAPDH способны образовывать активный тетрамер идентичных субъединиц в комплексе с NAD^+ . На основании этих факторов GAPDH использовалась в качестве стандарта для исследований экспрессии генов и структуры белков.

На сегодняшний день известно, что в дополнение к своей известной роли в гликолизе GAPDH участвует в апоптозе, транспорте железа, слиянии мембран, регуляции транскрипции, транспорте везикул из эндоплазматического ретикула в аппарат Гольджи и клеточных ответах на внешние воздействия, таких как окислительный стресс и гипоксия. И что важно для многофункциональных белков, все эти функции GAPDH распределены в разных частях клетки, включая клеточную мембрану, цитозоль и ядро. Принимая во внимание все ее многочисленные функции, GAPDH можно рассматривать как ярчайший пример белка, совмещающего несколько функций.

Однако при таком множестве возможных совмещений ферментативной активности должны существовать механизмы, с помощью которых клетки регулируют функциональное разнообразие GAPDH. Это необходимо для того, чтобы клетки могли не только “выбирать”, какая из множества функций GAPDH может быть активирована в данный момент времени, но и для реализации потребности изменения в ее субклеточной локализации.

Функциональное разнообразие GAPDH

Различные исследования показали, что клетки используют посттрансляционную модификацию GAPDH в качестве основного механизма контро-

ля, определяющего ее функции. Благодаря этим преобразованиям клетки могут использовать GAPDH для инициирования процессов в различных путях и субклеточных локализациях. Рассмотрение же принципов формирования “подрабатывающих” свойств у этого представителя белков домашнего хозяйства — хороший наглядный пример для понимания механизмов, отвечающих за функцию совмещения.

Многофункциональность GAPDH — прямой результат множества различных взаимодействий. Например, благодаря NAD^+ -связывающему домену GAPDH может взаимодействовать с последовательностями мРНК в 5'- или 3'-нетранслируемых областях, что важно для трансляционной регуляции экспрессии генов [44, 45]. В ядре GAPDH в виде мономерной изоформы была идентифицирована как специфический ДНК-связывающий белок, действующий как негистоновый ядерный белок, участвующий в усилении экспрессии генов. Кроме того, в ядре GAPDH может взаимодействовать с Arp4A, который участвует как в репликации ДНК, так и в ее репарации. Нарушение соотношения Arp4A/Arp3A (повышение уровня Arp4A и снижение Arp3A) связано с запрограммированной гибелью клеток [46].

В целом функции, которые выполняет GAPDH, формируются за счет ее киназной активности либо опосредованно через взаимодействие с другими белками.

Фосфорилирование GAPDH

Основная реакция фосфорилирования представляет собой опосредованное киназой добавление электроотрицательной фосфатной группы в качестве боковой цепи аминокислоты-мишени, что изменяет структуру белка из-за взаимодействий заряд-заряд, тем самым влияя на его функцию. Что касается GAPDH, недавно полученные

данные демонстрируют, что посттрансляционное фосфорилирование GAPDH необходимо в нормальных соматических клетках для переноса веществ через мембрану и для синаптической передачи [47]. Этот механизм связан с фосфорилированием рецептора ГАМК $GABA_A$, который обеспечивает быстрое торможение в головном мозге. Исследования показали, что GAPDH непосредственно фосфорилирует длинную внутриклеточную петлю субъединицы $\alpha 1$ рецептора $GABA_A$ по идентифицированным остаткам серина и треонина. Было обнаружено, что GAPDH и субъединица $\alpha 1$ локализованы на плазматической мембране нейронов. В соответствии с молекулярной ассоциацией рецепторов GAPDH/ $GABA_A$, гликолитический АТР, продуцируемый локально на плазматических мембранах, расходуется на фосфорилирование этой субъединицы $\alpha 1$.

Вновь синтезированные клеточные соединения могут нуждаться в сложных путях для их транспорта из одного субклеточного компартмента в другой. Таким образом, движение клеточных макромолекул из эндоплазматического ретикула (ЭР) в аппарат Гольджи — важный транспортный механизм, обеспечивающий в конечном итоге секрецию этих макромолекул. Недавние исследования продемонстрировали, что Rab2 GTPаза ответственна за формирование так называемых везикулярных тубулярных кластеров, промежуточных соединений пре-Гольджи [48]. GAPDH была идентифицирована как неотъемлемая часть этого комплекса [49]. Однако была показана не только необходимость GAPDH для Rab2 GTPаза-опосредованного транспорта из ЭР в аппарат Гольджи, но также обнаружено обязательное условие для этого транспорта — два специфических последовательных посттрансляционных фосфорилирования GAPDH [50]. Анализ *in vitro* показал, что существует определенная временная последовательность фосфорилирования, заключающегося в образовании фосфорилированной по серину serPGAPDH с последующим образованием serPGAPDHtyr41P по тирозиновому остатку. Дальнейшие исследования показали, что serPGAPDH может участвовать в формировании промежуточной структуры пре-Гольджи, в то время как serPGAPDHtyr41P необходима для фактической транслокации комплекса из ЭР в аппарат Гольджи. Механизм же заключается во взаимодействии GAPDH как с тубулином, так и с динеином — белками, которые отвечают за транспорт. В первом случае GAPDH формирует путь, по которому движется комплекс, во втором — обеспечивает процесс перемещения комплекса по этому внутриклеточному пути.

Нитрозилирование GAPDH

Оксид азота (NO) — значимая молекула вторичной передачи сигнала *in vivo*. Недавние исследования продемонстрировали, что посттрансляционная модификация GAPDH оксидом азота в ее цистеиновом активном центре (SNO-GAPDH) приводит к включению последнего в метаболизм гема, иммунный ответ и апоптоз. Также SNO-GAPDH используется клетками в качестве нитрозилазы, переносящей фрагмент оксида азота на другой белок.

Участие GAPDH в метаболизме гема

GAPDH играет значительную роль без дополнительных посттрансляционных модификаций в поглощении железа [51], внутриклеточном транспорте [52] и включении железа в апогем [53]. В данном случае GAPDH лигирует гем через остаток гистидина (His53), расположенный на гибкой петле в межпротомерном участке в тетрамерной форме GAPDH. Замена этого гистидина и последующее снижение связывания гема GAPDH противодействует доставке гема как к цитозольным, так и к ядерным гемопротеинам-мишеням, включая индуцибельную синтазу оксида азота (iNOS) в макрофагах мыши и ядерный фактор транскрипции Nrf1 в дрожжах, несмотря на то что GAPDH вызывала резкое повышение уровня лабильного гема в клетках. Таким образом, благодаря своему свойству лигирования гема нетрансформированная GAPDH создает пул, который биодоступен для нижестоящих белков.

Что касается SNO-GAPDH, серия исследований определила ее роль в регуляции метаболизма гема [54]. Первоначально было установлено, что оксид азота ингибирует включение гема в iNOS [55]. Однако впоследствии была определена взаимосвязь между образованием SNO-GAPDH, последующим уменьшением связывания гема, а также ингибированием встраивания гема в апо-iNOS [54]. Таким образом, в нативной форме GAPDH обеспечивает приток гема, а в окисленной форме его блокирует.

Апоптотическая и другие роли SNO-GAPDH

Роль GAPDH в апоптозе представляет собой, пожалуй, одну из наиболее значительных ее вспомогательных защитных функций. Механизм этой активности, в частности, определяется той же модификацией оксидом азота цистеина активного центра GAPDH. Это обеспечивает образование цитоплазматического комплекса SNO-GAPDH с белком Siah1 [56]. Siah1 действует как убиквитинлигаза E3 и участвует в апоптозе [57–59], служит для деградации ядерных белков во время запрограммированной гибели клеток в протеасомах. Однако сам по себе Siah1 нестабилен, характери-

зуется коротким периодом полураспада. Импульсный анализ в клетках показал, что трансфицированный Siah1 имеет период полураспада $T_{1/2} \sim 5$ мин. Напротив, котрансфекция с GAPDH с образованием комплекса приводила к увеличению его $T_{1/2}$ до 40 мин [56]. Таким образом, Siah1 обеспечивает ядерную протеасомную деградацию белков при апоптозе вследствие стабилизации, опосредованной SNO-GAPDH.

Существует механизм регулирования взаимодействия GAPDH с Siah. В нейронах мышей был обнаружен цитоплазматический белок GOSPEL (конкурент GAPDH с Siah Protein Enhances Life), действующий как негативный регулятор пути SNO-GAPDH. Оценка уровней мРНК белка GOSPEL показала, что он присутствует в наибольшем количестве в органах, наиболее обогащенных GAPDH, таких как мозг, сердце, легкие и скелетные мышцы. S-Нитрозилирование GOSPEL способствует его связыванию с S-нитрозилированной GAPDH, конкурируя с Siah1, сохраняя связанную с GOSPEL GAPDH в цитозоле и предотвращая цитотоксический эффект [60]. Однако как только уровень нитрозативного стресса превышает пороговое значение, связывание GAPDH–Siah1 преобладает над взаимодействием GAPDH–GOSPEL, что приводит к гибели или дисфункции клеток. Альтернативный механизм нарушения связывания SNO-GAPDH с Siah1 включает опосредованное SNO-GAPDH транснаитрозилирование B23/нуклеофозмина. Как следствие, это увеличивает взаимодействие SNO–B23 и Siah1, в то же время уменьшая уровень SNO-GAPDH и устраняя апоптотический эффект пути [61].

Также GAPDH вовлечена в последовательность апоптотических реакций, локализованных в ядре. Она связана с активацией белка p300/CBEB (CBP) путем образования комплекса с SNO-GAPDH. За этим происходит ацетилирование p53 комплексом CBP–SNO-GAPDH и последующая активация нескольких генов, связанных с апоптозом, включая *PUMA*, *Bax* и *p21* [62].

Отметим, что помимо многообразия совмещения функций самой GAPDH, модификация этого белка молекулой NO показывает также многообразие функциональной активности. Дополнительные свойства модифицированной формы были обнаружены в других исследованиях патологических состояний, связанных с опухолями и неврологическими расстройствами.

Опухолевые клетки используют серин/треонинкиназу Akt (белок, участвующий в регуляции клеточной пролиферации) в качестве средства, способствующего их выживанию. Этот защитный механизм включает фосфорилирование белка p40, впоследствии идентифицированного как GAPDH. Значение этой посттрансляционной мо-

дификации GAPDH изначально исследовали в клетках рака яичников [63]. В клетках, обработанных перекисью в качестве индуктора апоптоза, фосфорилирование GAPDH приводило к ингибированию апоптоза. Иммуноцитохимический анализ показал цитоплазматическую локализацию GAPDH, а в результате мутационного анализа был идентифицирован GAPDHthr237 как сайт фосфорилирования киназы Akt. Поскольку остаток thr237 расположен в сайте связывания комплекса SNO-GAPDH–Siah1, было высказано предположение, что эта посттрансляционная модификация предотвращает образование белкового комплекса SNO-GAPDH–Siah1 за счет стерических преобразований, тем самым предотвращая апоптотическое разрушение опухолевых клеток и обеспечивая их выживание.

С другой стороны, были проведены исследования нейродегенеративного и нейропротекторного действия факторов в отношении тау-белка [64, 65]. Тау-белок, который в большом количестве содержится в нейронах, первоначально был охарактеризован как белок, способный связывать и стабилизировать микротрубочки. Однако в настоящее время известно, что функции тау-белка выходят за рамки способности модулировать динамику микротрубочек: он играет опосредованную роль в аксональном транспорте, в синаптической структуре и функции, а также в сигнальных путях нейронов. Хотя тау-белок важен для функционирования нейронов, играет важную физиологическую роль в нейронах, его участие в нейродегенеративных заболеваниях и, что наиболее заметно, в патогенезе болезни Альцгеймера стимулировало исследования в этом направлении. Нейробелок тау интересен тем, что в проявлениях его биологических эффектов и патологических отклонений ключевая роль принадлежит GAPDH. Было обнаружено, что ацетилирование тау (Ac-tau) происходит опосредованно с SNO-GAPDH, которая одновременно инактивирует сиртуин-1 (Sirt1) и активирует p300/CBP-ацетилтрансферазу, увеличивая уровень нейронального Ac-tau. Последующая неправильная локализация тау-белка вызывает нейродегенерацию и нейроповеденческие нарушения, а также при этом Ac-tau накапливается в крови. В эксперименте на мышах блокирование S-нитрозилирования GAPDH, ингибирование p300/CBP или стимуляция Sirt1 обеспечивало защиту от нейродегенерации, нейроповеденческих нарушений и накопления Ac-tau в крови и мозге. У пациентов же, получающих ингибиторы p300/CBP сальсалат или дифлунизал, наблюдалось снижение частоты симптомов болезни Альцгеймера [65].

Другое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание – болезнь Гентингтона – пример наиболее сложных взаимодействий белков, в которых задействована GAPDH. Известно, что для

поддержания гомеостаза белка клеткам необходимо обеспечить не только строгий контроль синтеза белка наряду с точным сворачиванием для поддержания правильной конформации белка, но и деградацию любых неправильно свернутых белков. Один из механизмов этой регуляции — аутофагия. Белки, ускользающие от “точек контроля качества”, могут образовывать агрегаты. Агрегация и неправильный фолдинг белков приводят к протеинопатиям, которые в случае нейрональных клеток служат фактором развития нейродегенеративных заболеваний. GAPDH играет важную роль в аутофагии за счет регуляции этого процесса различными путями [66, 67]. Установлено, что один из механизмов проявляется в условиях низкого уровня глюкозы, в результате которого наблюдается ингибирование передачи сигналов mTOR за счет взаимодействия между GAPDH и суперсемейством Ras GTPаз Rheb, что предотвращает связывание Rheb с mTOR и регулирует взаимодействие между путем гликолиза и путем mTORC1 [68]. Таким образом, GAPDH может стимулировать аутофагию, т.к. ингибирование mTOR индуцирует этот процесс [69]. Авторы, которые ранее установили роль GAPDH в качестве рецептора для белков-переносчиков железа трансферрина и лактоферрина, оценили связь мутантной формы белка гентингтина (mHtt), GAPDH и mTOR [70]. Используя модельную систему клеточной культуры со сверхэкспрессией GAPDH, экспрессирующую мутантный белок mHtt, авторы наблюдали меньшее количество неправильно свернутых белковых агрегатов и более высокий уровень аутофагии по сравнению с таковыми в контрольных клетках. Было установлено, что сверхэкспрессия GAPDH оказывает защитное действие на клетки, приводя к снижению нагрузки белковыми агрегатами, и способствует их расщеплению путем индукции аутофагии.

Важно подчеркнуть, что GAPDH оказывает негативное влияние на аутофагию. Было установлено, что GAPDH — ключевой фактор образования агрегатов с такими белками, как mHtt или β -амилоид, и формирования амилоидоза [71]. В исследованиях *in vitro* было показано, что окисление GAPDH вызывает структурные изменения и образование межмолекулярных дисульфидных связей, которые приводят к агрегации этого фермента [72]. Наиболее чувствительная мишень для оксидантов в GAPDH — остаток Cys152, находящийся в активном центре фермента и принимающий непосредственное участие в каталитической реакции. Окисленная форма фермента может легко диссоциировать, денатурировать, агрегировать или взаимодействовать с другими биомолекулами [73–75]. Именно окисленная GAPDH способна образовывать комплекс с растворимым β -амилоидом и ускорять его агрегацию [76]. Напротив, восста-

новленная форма GAPDH не способна образовывать устойчивый комплекс с β -амилоидом. В случае болезни Гентингтона сверхэкспрессия GAPDH или Siah1 усиливает ядерную транслокацию mHtt и, собственно, его цитотоксичность [77]. Нейропротекторное действие некоторых антиапоптотических препаратов включает блокаду системы GAPDH/Siah1 и ингибирование агрегации GAPDH для снижения последствий нейродегенеративных заболеваний [78, 79]. Таким образом, GAPDH — внутриклеточный сенсор окислительного стресса и ключевой фактор аутофагии, а ее олигомерное состояние и склонность к агрегации зависят от метаболического состояния клетки, т.е. от активности антиоксидантной системы и уровня окислительного стресса [80, 81].

С другой стороны, GAPDH может действовать как фактор выживания посредством индукции аутофагии при раке для поддержки потребления энергии за счет быстрой пролиферации клеток. Colell et al. показали, что ядерная GAPDH защищает клетки от каспазозависимой гибели клеток, индуцируя аутофагию [82]. Поскольку ядерная GAPDH участвует в регуляции транскрипции [83], авторы предположили, что GAPDH может прямо или косвенно регулировать транскрипцию ATG12 — убиквитин-подобного белка, участвующего в образовании везикул для аутофагии. Таким образом, GAPDH координирует два метаболических пути, продуцирующих АТФ путем гликолиза и удаляющих поврежденные митохондрии путем аутофагии, чтобы предотвратить каспазозависимую гибель клеток [82, 84].

Модификация GAPDH *N*-ацетилглюкозамином

Структурно-функциональный анализ GAPDH позволяет предположить, что многие виды активности этого фермента зависят от олигомерной ассоциации. Например, тетрамерная структура GAPDH выполняет свою классическую роль в гликолизе.

Исследования этого вопроса свидетельствуют о том, что *N*-ацетилглюкозамин в связи с GAPDH может обеспечивать регуляцию третичной или четвертичной структуры GAPDH [85]. Было показано, что большая часть GAPDH, модифицированной *N*-ацетилглюкозамином, присутствует в виде мономера с молекулярной массой 37 кДа. Мутационный анализ продемонстрировал, что GAPDH, локализованная в цитоплазме, содержала модифицированную аминокислоту T227A в отличие от GAPDH с ядерной локализацией, в которой присутствовала *N*-ацетилглюкозаминовая модификация. За счет такого механизма транслокации в ядро клетки GAPDH принимает участие в регуляции во многих клеточных процессах, описанных выше, в нормальных условиях и при окислительном стрессе.



Рис. 3. Функциональное разнообразие влияния GAPDH на различные процессы в клетке.

Таким образом, всевозможные функции белков-совместителей, показанные на примере GAPDH, проявляющей исключительную многофункциональность, могут быть опосредованы как самим белком, так и его модификациями (рис. 3).

Результирующий список всех функций даже одного белка сложно предсказать и определить. Поэтому для таких белков были созданы специальные отдельные базы данных об обнаруженных свойствах, как, например, MoonDB (<http://moondb.hb.univ-amu.fr/>) или MoonProt (<http://www.moonlightingproteins.org/>). Эти базы постоянно обновляются, пополняются все новыми белками и новыми открытыми функциями.

МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ

Помимо описанных механизмов функционирования в клетках белки-совместители имеют и другие неожиданные свойства. Известно ~700 многофункциональных белков с изученными функциями, вовлеченных в вирулентность бактериальных и грибковых патогенов, при этом четверть из них — белки вирулентности патогенов [86]. Это прежде всего высококонсервативные белки домашнего хозяйства, имеющие функции шаперонов и участвующие в реакции на стресс или в метаболизме. Способность этих белков менять функцию во время патологического процесса зависит от их выведения из клетки, происходящего без использования характерных механизмов

секреции [87–89]. Точно так же прикрепление этих белков к клеточной поверхности недостаточно изучено [89]. Оказавшись вне прокариотических или эукариотических патогенов, они опосредуют клеточную передачу сигналов или адгезию и могут даже действовать как токсины.

Во время межклеточных взаимодействий GAPDH берет на себя множество биологических функций. Например, она проявляет разную активность у четырех видов *Streptococcus* [87, 88]. У *S. pyogenes* GAPDH на клеточной поверхности действует как адгезин [90] и инвазин [91], а также передает сигналы клеткам-хозяевам [91, 92]. Она также функционирует как белок уклонения от нейтрофилов [93]. У *S. agalactiae* GAPDH выступает иммуномодулятором, стимулирующим В-клетки [94]. У *S. pneumoniae* GAPDH связывает плазминоген [95], а у *S. suis* GAPDH функционирует как гем-связывающий белок [96], альбумин-связывающий белок [97] и адгезин [98]. GAPDH — важный фактор адгезии *Mycoplasma hyorhinis* и рецептор для захвата плазминогена хозяина, что увеличивает направленность протеолиза и способствует распространению *M. hyorhinis* [99]. Энтерогеморрагические и энтеропатогенные штаммы *Escherichia coli* также экспрессируют GAPDH на клеточной поверхности, тогда как у непатогенных штаммов этого не наблюдается. В патогенных штаммах GAPDH связывает фибриноген и плазминоген [88]. У *M. genitalium* GAPDH играет роль белка клеточной поверхности, участвующего в связывании муцина [100]. Вполне вероятно, что по мере изучения большего количества видов

бактерий будет обнаружено больше дополнительных ролей GAPDH.

Енолаза — пример белка с похожим механизмом. Внутри клетки енолаза катализирует превращение 2-фосфолицерата в фосфоенолпирuvat при гликолизе. Енолаза у *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus anthracis*, *Neisseria meningitidis*, *S. pneumoniae*, *Trichomoniasis vaginalis* и *Lactobacillus crispatus* может связываться с плазминогеном хозяина [101–106]. Связывание плазминогена играет важную роль в инвазии тканей хозяина, потому что после связывания с рецептором клеточной поверхности плазминоген превращается в активную протеазу — плазмин, который может способствовать разрушению внеклеточного матрикса хозяина и инвазии тканей [107, 108]. У некоторых видов локализованная на поверхности енолаза и другие белки подработки связываются с другими белками-хозяевами поверхностей слизистых оболочек для модулирования иммунной системы хозяина. Енолаза *S. suis* также может связываться с фибронектином хозяина, а енолаза *Staphylococcus aureus* — с ламинином [109, 110].

Обнаруженные различные механизмы действия многофункциональных белков позволяют понять то, что все известные белки могут иметь множество еще не установленных функций за счет простых преобразований их структуры. Однако белки обладают и другими функциональными проявлениями помимо описанных примеров совмещения ролей. Небольшой ряд белков за счет их нетипичных свойств был выделен в отдельные классы псевдоферментов, метаморфов и морфеинов.

ПСЕВДОФЕРМЕНТЫ

Псевдофермент представляет собой белок или домен в белке, который имеет аминокислотную

последовательность и трехмерную укладку, напоминающую обычный каталитически активный фермент, но не обладающий каталитической активностью [111–116].

Во многих случаях субъединица псевдофермента взаимодействует с каталитически активными гомологами посредством прямого связывания и регуляции катализа или служит каркасом для сборки мультибелкового комплекса, содержащего активные гомологи. Трехмерная структура псевдофермента может быть достаточно близкой к структуре активного гомолога для связывания субстрата, кофактора или металлов, но вместо использования каталитической активности связывание лиганда выступает в качестве регулятора другой функции.

Первым псевдоферментом, о котором было сообщено, был α -лактальбумин (LA), гомолог лизоцима, который экспрессируется в молочной железе и действует как регуляторная субъединица лактозосинтазы [117]. Лактозосинтаза представляет собой комплекс из каталитической субъединицы β -1,4-галактозилтрансферазы и некаталитической субъединицы LA (1 : 1). Без LA β -1,4-галактозилтрансфераза переносит галактозильный остаток UDP-галактозы на *N*-ацетилглюкозамин или олигосахариды, содержащие *N*-ацетилглюкозамин (рис. 4).

Когда LA связывается с β -1,4-галактозилтрансферазой, он помогает глюкозе связываться в активном центре фермента, образуя водородную связь с гидроксильной группой сахара, а также блокируя связывание олигосахаридов. Эти взаимодействия снижают K_m для глюкозы в ~ 1000 раз, что способствует переносу остатка галактозила на глюкозу вместо *N*-ацетилглюкозамина и приводит к синтезу лактозы в молочных железах [118, 119].

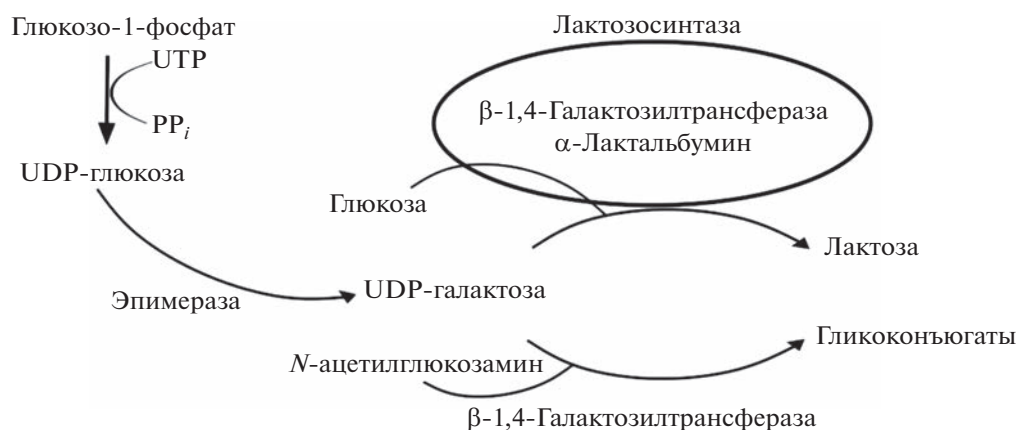


Рис. 4. Участие β -1,4-галактозилтрансферазы в образовании лактата. Галактоза под действием β -1,4-галактозилтрансферазы может принимать участие в образовании глюкоконъюгатов при связывании с *N*-ацетилглюкозамином или лактозы в случае взаимодействия с лактозосинтазой, состоящей из β -1,4-галактозилтрансферазы и псевдофермента α -лактальбумина.

Псевдоферменты в настоящее время известны в десятках семейств белков, включая псевдокиназы, псевдодубиквитиנגлазы, псевдодеубиквити-назы, псевдонуклеазы и псевдонуклеозидтри-фосфатазы.

МЕТАМОРФЫ И МОРФЕИНЫ

Метаморфные белки — следующий уровень сложности в нашем понимании структуры и функций белков [120, 121]. Они имеют две или более складчатых структур в качестве своих нативных форм, а в некоторых случаях разные структуры выполняют разные функции. В отличие от внутренне неупорядоченных белков, у которых нативные состояния свернуты или развернуты, метаморфные белки одновременно свернуты и структурированы. Взаимопревращения между этими формами обратимы, что означает, что в равновесии существует баланс между этими состояниями [122]. Хотя наличие двух стабильных форм фолдинга может противоречить термодинамическим принципам сворачивания белка, при которых конечная форма белка имеет в целом самую низкую свободную энергию, было показано, что две нативные структуры могут иметь одинаковую энергию с низкой активацией барьера рефолдинга [123]. К настоящему времени обнаружено небольшое количество метаморфных белков, в том числе лимфотактин, RfaH, CLIC1, Mad2, KaiB, IscU, селеказа и обратная транскриптаза ВИЧ-1, из которых первые три — также многофункциональные белки [124–131].

Для примера, хемокин лимфотактин семейства C (Ltn) — метаморфический белок, а также многофункциональный белок с гепарин-связывающей активностью [132]. В нормальных физио-

логических условиях (37°C и 150 mM NaCl) лимфотактин находится в равновесии между двумя нативными состояниями, Ltn10 и Ltn40. Ltn10 представляет собой мономер, имеющий β -лист и α -спираль в канонической хемокиновой складке, который подвергается повторной укладке и димеризации, превращаясь в Ltn40, содержащий β -сэндвич и удвоенную α -спираль (рис. 5).

В то время как Ltn10 — агонист хемокинового рецептора 1, связанного с XC-мотивом G-белка (XCR1), Ltn40 не может связываться с XCR1, но вместо этого может связываться с гепарином, гликозаминогликановым компонентом внеклеточного матрикса. В равновесии имеется почти равное количество Ltn10 и Ltn40. Взаимопревращения между Ltn10 и Ltn40 можно контролировать небольшими изменениями концентрации соли и температуры. При высокой концентрации соли и низкой температуре преобладает вид Ltn10, однако при более низких концентрациях соли и более высоких температурах, но не превышающих 40°C, преобладает вид Ltn40 [133]. Большинство других хемокинов, по-видимому, не подвергаются этим превращениям, потому что они содержат две дисульфидные связи. Поскольку лимфотактин имеет только одну дисульфидную связь, он менее ограничен и более гибок в изменении конформации по сравнению с другими хемокинами, что частично объясняет обратимость между двумя различными нативными структурами.

Морфеины же представляют из себя субъединицы белков, образующие мультимер, который может разбираться, изменять конформацию (без рефолдинга) и собираться в другой мультимер [134].

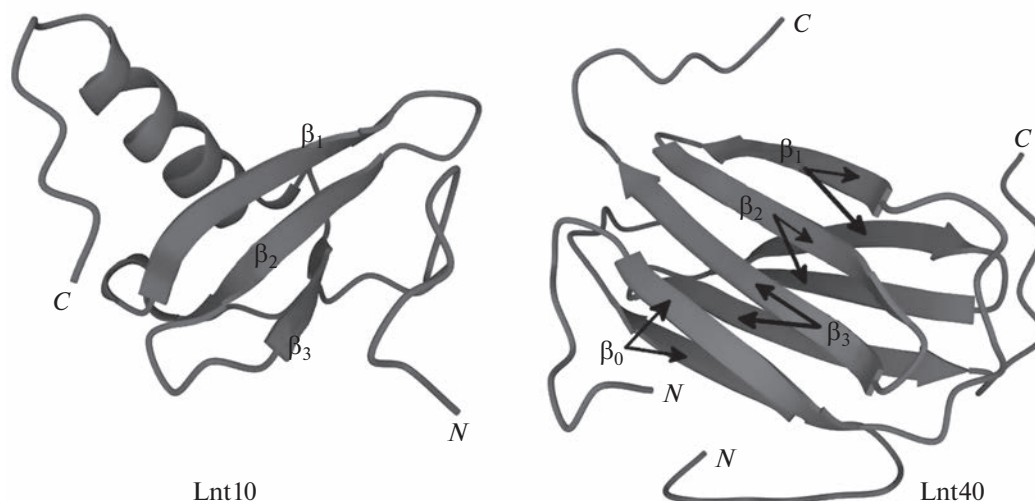


Рис. 5. Структуры цепей лимфотактина из базы данных белков Ltn10 (PDB: 2HDM) и Ltn40 (PDB: 2JP1). Ltn10 представлен мономером, имеющим β -лист и α -спираль. Ltn40 — результат димеризации с образованием β -сэндвича.

Порфобилиногенсинтаза, известная как дегидратаза δ -аминолевулиновой кислоты, — это прототип морфеина. Она имеет два олигомерных состояния, которые коррелируют с различными уровнями ферментативной активности и связывания аллостерических эффекторов [135]. Октамер может распадаться на димеры. Будучи частями димера, домены внутри субъединиц могут сдвигаться в своих относительных положениях, что приводит к образованию субъединиц с другой конформацией, которые затем могут собираться в гексамер. В то время как эти различные гомомультимеры различаются по уровню активности фермента порфобилиногенсинтазы, этот белок также выступает белком подработки, поскольку у него есть вторая функция — связывание с протеасомой и ее ингибирование [136, 137].

Описанная на рис. 2 протеаза DegP также относится к морфеинам. У этого белка при низких температурах, помимо описанных конформационных изменений в тримерные и гексамерные формы, протеазная активность может быть запущена самими субстратами, которые опосредуют образование протеолитических 12/24-мерных единиц за счет временных взаимодействий между доменами [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С тех пор как более 30 лет назад впервые была представлена концепция совместного использования генов для совмещения функций белков, по-новому стали оцениваться молекулярные связи между совершенно разными биологическими процессами.

Многофункциональные белки, включая метаморфные и морфеиновые, взаимодействуют по сложной схеме. Поскольку клеточные условия изменяются из-за метаболизма и факторов окружающей среды, функции этих белков преобразуются, что приводит к различным комбинациям межбелковых взаимодействий и процессов. В литературе, посвященной данному вопросу, четко прослеживается мысль о том, что многообразие проявлений поднимает важный вопрос о классификации этих белков. Их название в нынешнем виде не согласуется с теми функциями, которые белок выполняет. Ключевое разногласие исходит из того, что фермент называется по субстрату, когда функции самого белка могут выходить далеко за эти пределы. При этом сложность и различие в самих процессах и множестве объектов делают их исследование затруднительным. Хорошие примеры — фосфоглюкозоизомераза и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. У первого фермента существуют другие названия — от нейралекина до фактора созревания, что вносит больше путаницы, чем упорядочивания. У GAPDH нет подмно-

жества названий, но ее обозначение никак не отражает всех ролей этого фермента.

С другой стороны, что более важно, это вопрос выявления механизмов и вовлеченности белков в совмещение ролей. Дизайн исследования процессов в клетке требует весьма многостороннего анализа и различных методов исследования. Открытие многофункциональных белков до сих пор носит случайный характер, и их целевой поиск весьма трудоемок, поэтому изучение обозначенной проблемы идет очень медленно. Однако раскрытие механизмов и функций в данной сфере однозначно может расширить наши представления о физиологии клетки и поднять медицину на совершенно иной уровень, т.к. проблемы лечения и разработки новых лекарственных средств — прямое отражение уровня нашего познания жизнедеятельности живых систем.

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. Ingolia T.D., Craig E.A. // PNAS. 1982. V. 79. P. 2360–2366.
<https://doi.org/10.1073/pnas.79.7.2360>
2. Bhat S.P., Nagineni C.N. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. V. 158. P. 319–325.
[https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(89\)80215-3](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(89)80215-3)
3. Dubin R.A., Wawrousek E.F., Piatigorsky J. // Mol. Cell. Biol. 1989. V. 9. P. 1083–1091.
[https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(89\)80215-3](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(89)80215-3)
4. Iwaki T., Kume-Iwaki A., Liem R.K., Goldman J.E. // Cell. 1989. V. 57. P. 71–78.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90173-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90173-6)
5. Moscona A.A., Fox L., Smith J., Degenstein L. // PNAS. 1985. V. 82. P. 5570–5573.
<https://doi.org/10.1073/pnas.82.16.5570>
6. Piatigorsky J., O'Brien W.E., Norman B.L., Kalumuck K., Wistow G.J., Borras T., Nickerson J.M., Wawrousek E.F. // PNAS. 1988. V. 85. P. 3479–3483.
<https://doi.org/10.1073/pnas.85.10.3479>
7. Wistow G.J., Mulders J.W., de Jong W.W. // Nature. 1987. V. 326. P. 622–624.
<https://doi.org/10.1038/326622a0>
8. Piatigorsky J., Wistow G.J. // Cell. 1989. V. 57. P. 197–99.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90956-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90956-2)
9. Jeffery C.J. // Trends Biochem. Sci. 1999. V. 24. P. 8–11.
[https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01335-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01335-8)

10. Jeffery C.J. // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2018. V. 373. P. 20160523.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0523>
11. Jeffery C.J. // Front Genet. 2015. V. 19. P. 211.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00211>
12. Banerjee S., Nandyala A.K., Raviprasad P., Ahmed N., Hasnain S.E. // J. Bacteriol. 2007. V. 189. P. 4046–4052.
<https://doi.org/10.1128/JB.00026-07>
13. Beinert H., Kennedy M.C. // FASEB J. 1993. V. 7. P. 1442–1449.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.7.15.8262329>
14. Beinert H., Kennedy M.C., Stout C.D. // Chem. Rev. 1996. V. 96. P. 2335–2374.
<https://doi.org/10.1021/cr950040z>
15. Esquilin-Lebron K., Dubrac S., Barras F., Boyd J.M. // mBio. 2021. V. 12. P. e0242521.
<https://doi.org/10.1128/mBio.02425-21>
16. Beinert H., Holm R.H., Munck E. // Science. 1997. V. 277. P. 653–659.
<https://doi.org/10.1126/science.277.5326.653>
17. Kang D.K., Jeong J., Drake S.K., Wehr N.B., Rouault T.A., Levine R.L. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 14857–14864.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M300616200>
18. Haile D.J., Rouault T.A., Tang C.K., Chin J., Harford J.B., Klausner R.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 7536–7540.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7536>
19. Rouault T., Klausner R. // Curr. Top. Cell. Regul. 1997. V. 35. P. 1–19.
[https://doi.org/10.1016/s0070-2137\(97\)80001-5](https://doi.org/10.1016/s0070-2137(97)80001-5)
20. Fillebeen C., Pantopoulos K. // Redox Rep. 2002. V. 7. P. 15–22.
<https://doi.org/10.1179/135100002125000136>
21. Alén C., Sonenshein A.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 10412–10417.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.18.10412>
22. Koeller D.M., Casey J.L., Hentze M.W., Gerhardt E.M., Chan L., Klausner R.D., Harford J.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 3574–3578.
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.10.3574>
23. Bohne A.V., Schwarz C., Schottkowski M., Lidschreiber M., Piotrowski M., Zerges W., Nickelsen J. // PLoS Biol. 2013. V. 11. P. e1001482.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001482>
24. Bohne A.V., Nickelsen J. // Mol. Plant. 2017. V. 10. P. 1–3.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.08.002>
25. Guan Y., Rawsthorne S., Scofield G., Shaw P., Doonan J. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 5412–5417.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.10.5412>
26. Ke J., Behal R.H., Back S.L., Wurtele E.S., Oliver D.J. // Plant. Physiol. 2000. V. 123. P. 497–508.
<https://doi.org/10.1104/pp.123.2.497>
27. Mooney B.P., Miernyk J.A., Randall D.D. // Annu. Rev. Plant. Biol. 2002. V. 53. P. 357–375.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135251>
28. Wilson J.E. // J. Exp. Biol. 2003. V. 206. P. 2049–2057.
<https://doi.org/10.1242/jeb.00241>
29. Gancedo J.M. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. V. 62. P. 334–361.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.334-361.1998>
30. Boukouris A.E., Zervopoulos S.D., Michelakis E.D. // Biochem. Sci. 2016. V. 41. P. 712–730.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.05.013>
31. Faik P., Walker J.I.H., Redmill A.A.M., Morgan M.J. // Nature. 1988. V. 332. P. 455–456.
<https://doi.org/10.1038/332455a0>
32. Chaput M., Claes V., Portetelle D., Cludts I., Cravador A., Burny A., Gras H., Tartar A. // Nature. 1988. V. 332. P. 454–455.
<https://doi.org/10.1038/332454a0>
33. Chou C.C., Sun Y.J., Meng M., Hsiao C.D. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 23154–23160.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M002017200>
34. Arsenieva D., Hardre R., Salmon L., Jeffery C.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 5872–5877.
<https://doi.org/10.1073/pnas.052131799>
35. Korshunov D.A., Kondakova I.V., Shashova E.E. // Biochemistry (Mosc). 2019. V. 84. P. 1129–1142.
<https://doi.org/10.1134/S000629791910002X>
36. Teixeira F., Tse E., Castro H., Makepeace K.A.T., Meinen B.A., Borchers C.H., Poole L.B., Bardwell J.C., Tomás A.M., Southworth D.R., Jakob U. // Nat. Commun. 2019. V. 10. P. 659.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08565-8>
37. Jang H.H., Lee K.O., Chi Y.H., Jung B.G., Park S.K., Lee J.R., Lee S.S., Moon J.C., Yun J.W., Choi Y.O., Kim W.Y., Kang J.S., Cheong G.W., Yun D.J., Rhee S.G., Cho M.J., Lee S.Y. // Cell. 2004. V. 117. P. 625–635.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.002>
38. Krojer T., Garrido-Franco M., Huber R., Ehrmann M., Clausen T. // Nature. 2002. V. 416. P. 455–459.
<https://doi.org/10.1038/416455a>
39. Šulskis D., Thoma J., Burmann B.M. // Sci. Adv. 2021. V. 10. P. eabj1816.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abj1816>
40. Bruns G., Gerald P. // Science. 1976. V. 192. P. 54–56.
<https://doi.org/10.1126/science.176725>
41. Bruns G., Lalley P., Francke U., Minna J. // Cell Genet. 1979. V. 25. P. 139.
42. Mezquita J., Pau M., Mezquita C. // J. Cell. Biochem. 1998. V. 71. P. 127–139.
43. Vollberg T., Cool B., Sirover M. // Cancer Res. 1987. V. 47. P. 123–128.
44. Nagy E., Rigby W.F. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 2755–2763.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.6.2755>
45. Schultz D.E., Hardin C.C., Lemon S.M. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 14134–14142.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.24.14134>

46. Vartanian A., Prudovsky I., Suzuki H., Dal Pra I., Kiselev L. // *FEBS Lett.* 1997. V. 415. P. 160–162.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)01086-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)01086-7)
47. Laschet J.J., Minier F., Kurcewicz I., Bureau M.H., Trotter S., Jeanneteau F., Griffon N., Samyn B., Van Beeumen J., Louvel J., Sokoloff P., Pumain R. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. P. 7614–7622.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0868-04.2004>
48. Tisdale E.J. // *Mol. Biol. Cell.* 1999. V. 10. P. 837–849.
<https://doi.org/10.1091/mbc.10.6.1837>
49. Tisdale E.J. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 2480–2486.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M007567200>
50. Tisdale E.J. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 3334–3341.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109744200>
51. Raje C.I., Kumar S., Harle A., Nanda J.S., Raje M. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 3252–3261.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M608328200>
52. Sweeny E.A., Singh A.B., Chakravarti R., Martinez-Guzman O., Saini A., Haque M.M., Garee G., Dans P.D., Hannibal L., Reddi A.R., Stuehr D.J. // *J. Biol. Chem.* 2018. V. 293. P. 14557–14568.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004169>
53. Hannibal L., Collins D., Brassard J., Chakravarti R., Vempati R., Dorlet P., Santolini J., Dawson J.H., Stuehr D.J. // *Biochemistry.* 2012. V. 51. P. 8514–8529.
<https://doi.org/10.1021/bi300863a>
54. Chakravarti R., Aulak K.S., Fox P.L., Stuehr D.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 18004–18009.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1008133107>
55. Albakri Q.A., Stuehr D.J. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 5414–5421.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.10.5414>
56. Hara M.R., Agrawal N., Kim S.F., Cascio M.B., Fujimuro M., Ozeki Y., Takahashi M., Cheah J.H., Tankou S.K., Hester L.D., Ferris C.D., Hayward S.D., Snyder S.H., Sawa A. // *Nat. Cell. Biol.* 2005. V. 7. P. 665–674.
<https://doi.org/10.1038/ncb1268>
57. Hu G., Chung Y.L., Glover T., Valentine V., Look A.T., Fearon E.R. // *Genomics.* 1997. V. 46. P. 103–111.
<https://doi.org/10.1006/geno.1997.4997>
58. Li S., Li Y., Carthew R.W., Lai Z.C. // *Cell.* 1997. V. 90. P. 469–478.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80507-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80507-3)
59. Tang A.H., Neufeld T.P., Kwan E., Rubin G.M. // *Cell.* 1997. V. 90. P. 459–467.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80506-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80506-1)
60. González M.C., Romero J.M., Ingaramo M.C., Muñoz Sosa C.J., Curtino J.A., Carrizo M.E. // *FEBS Lett.* 2016. V. 590. P. 2210–2220.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.12242>
61. Lee S.B., Kim C.K., Lee K.H., Ahn J.Y. // *J. Cell. Biol.* 2012. V. 199. P. 65–76.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201205015>
62. Sen N., Hara M.R., Kornberg M.D., Cascio M.B., Bae B.I., Shahani N., Thomas B., Dawson T.M., Dawson V.L., Snyder S.H., Sawa A. // *Nat. Cell. Biol.* 2008. V. 10. P. 866–873.
<https://doi.org/10.1038/ncb1747>
63. Huang Q., Lan F., Zheng Z., Xie F., Han J., Dong L., Xie Y., Zheng F. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 42211–42220.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.296905>
64. Sen T., Saha P., Sen N. // *Sci. Signal.* 2018. V. 11. P. eaao6765.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aao6765>
65. Shin M.K., Vázquez-Rosa E., Koh Y., Dhar M., Chaubey K., Cintrón-Pérez C.J., Barker S., Miller E., Franke K., Noterman M.F., Seth D., Allen R.S., Motz C.T., Rao S.R., Skelton L.A., Pardue M.T., Fliesler S.J., Wang C., Tracy T.E., Gan L., Liebl D.J., Savarraj J.P.J., Torres G.L., Ahnstedt H., McCullough L.D., Kitagawa R.S., Choi H.A., Zhang P., Hou Y., Chiang C.W., Li L., Ortiz F., Kilgore J.A., Williams N.S., Whitehair V.C., Gefen T., Flanagan M.E., Stamler J.S., Jain M.K., Kraus A., Cheng F., Reynolds J.D., Pieper A.A. // *Cell.* 2021. V. 184. P. 2715–2732.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.032>
66. Guha P., Harraz M.M., Snyder S.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 1417–1422.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1524860113>
67. Chang C., Su H., Zhang D., Wang Y., Shen Q., Liu B., Huang R., Zhou T., Peng C., Wong C.C., Shen H.M., Lippincott-Schwartz J., Liu W. // *Mol. Cell.* 2015. V. 60. P. 930–940.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.037>
68. Lee M.N., Ha S.H., Kim J., Koh A., Lee C.S., Kim J.H., Jeon H., Kim D.H., Suh P.G., Ryu S.H. // *Mol. Cell. Biol.* 2009. V. 29. P. 3991–4001.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00165-09>
69. Jung C.H., Ro S.H., Cao J., Otto N.M., Kim D.H. // *FEBS Lett.* 2010. V. 584. P. 1287–1295.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.017>
70. Chaudhary S., Dhiman A., Dilawari R., Chaubey G.K., Talukdar S., Modanwal R., Patidar A., Malhotra H., Raje C.I., Raje M. // *Mol. Neurobiol.* 2021. V. 58. P. 5790–5798.
<https://doi.org/10.1007/s12035-021-02532-5>
71. Lazarev V.F., Tsolaki M., Mikhaylova E.R., Benken K.A., Shevtsov M.A., Nikotina A.D., Lechpammer M., Mitkevich V.A., Makarov A.A., Moskalev A.A., Kozin S.A., Margulis B.A., Guzhova I.V., Nudler E. // *Aging. Dis.* 2021. V. 12. P. 1223–1237.
<https://doi.org/10.14336/AD.2020.1230>
72. Samson A.L., Knaupp A.S., Kass I., Kleifeld O., Marianovic E.M., Hughes V.A., Lupton C.J., Buckle A.M., Bottomley S.P., Medcalf R.L. // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. P. 26922–26936.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.570275>
73. Nakajima H., Amano W., Fujita A., Fukuhara A., Azuma Y.T., Hata F., Inui T., Takeuchi T. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 26562–26574.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M704199200>

74. Nakajima H., Amano W., Fukuhara A., Kubo T., Misaki S., Azuma Y.T., Inui T., Takeuchi T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. V. 390. P. 1066–1071.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.118>
75. Nakajima H., Amano W., Kubo T., Fukuhara A., Ihara H., Azuma Y.T., Tajima H., Inui T., Sawa A., Takeuchi T. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 34331–34341.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.027698>
76. Itakura M., Nakajima H., Kubo T., Semi Y., Kume S., Higashida S., Kaneshige A., Kuwamura M., Harada N., Kita A., Azuma Y.T., Yamaji R., Inui T., Takeuchi T. // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. P. 26072–26087.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.669291>
77. Bae B.I., Hara M.R., Cascio M.B., Wellington C.L., Hayden M.R., Ross C.A., Ha H.C., Li X.J., Snyder S.H., Sawa A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 3405–3409.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0511316103>
78. Hara M.R., Thomas B., Cascio M.B., Bae B.I., Hester L.D., Dawson V.L., Dawson T.M., Sawa A., Snyder S.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 3887–3889.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0511321103>
79. Lazarev V.F., Nikotina A.D., Semenyuk P.I., Evstafyeva D.B., Mikhaylova E.R., Muronetz V.I., Shevtsov M.A., Tol-kacheva A.V., Dobrodumov A.V., Shavarda A.L., Gu-zhova I.V., Margulis B.A. // Free Radic. Biol. Med. 2016. V. 92. P. 29–38.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.025>
80. Muronetz V.I., Barinova K.V., Stroylova Y.Y., Semenyuk P.I., Schmalhausen E.V. // Int. J. Biol. Macromol. 2017. V. 100. P. 55–66.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.066>
81. Muronetz V.I., Melnikova A.K., Saso L., Schmalhausen E.V. // Curr. Med. Chem. 2020. V. 27. P. 2040–2058.
<https://doi.org/10.2174/0929867325666180530101057>
82. Colell A., Ricci J.E., Tait S., Milasta S., Maurer U., Bouchier-Hayes L., Fitzgerald P., Guio-Carrion A., Waterhouse N.J., Li C.W., Mari B., Barbry P., Newmeyer D.D., Beere H.M., Green D.R. // Cell. 2007. V. 129. P. 983–997.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.045>
83. Zheng L., Roeder R.G., Luo Y. // Cell. 2003. V. 114. P. 255–266.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00552-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00552-x)
84. Song S., Finkel T. // Nat. Cell Biol. 2007. V. 9. P. 869–870.
<https://doi.org/10.1038/ncb0807-869>
85. Park J., Han D., Kim K., Kang Y., Kim Y. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1794. P. 254–262.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.10.003>
86. Franco-Serrano L., Cedano J., Perez-Pons J.A., Mozo-Villarias A., Piñol J., Amela I., Querol E. // Pathog. Dis. 2018. V. 76. P. fty046.
<https://doi.org/10.1093/femspd/fty046>
87. Henderson B. // Biochem. Soc. Trans. 2014. V. 42. P. 1720–1727.
<https://doi.org/10.1042/BST20140236>
88. Henderson B., Martin A. // Infect. Immun. 2011. V. 79. P. 3476–3491.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00179-11>
89. Wang W.F., Jeffery C.J. // Mol. Biosyst. 2016. V. 12. P. 1420–1431.
<https://doi.org/10.1039/c5mb00550g>
90. Pancholi V., Fischetti V.A. // J. Exp. Med. 1992. V. 176. P. 415–426.
<https://doi.org/10.1084/jem.176.2.415>
91. Pancholi V., Fischetti V.A. // J. Exp. Med. 1997. V. 186. P. 1633–1634.
<https://doi.org/10.1084/jem.186.10.1633>
92. Pancholi V., Fischetti V.A. // PNAS. 1993. V. 90. P. 8154–8158.
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.8154>
93. Terao Y., Yamaguchi M., Hamada S., Kawabata S. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 14215–14223.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M513408200>
94. Madureira P., Baptista M., Vieira M., Magalhães V., Camelo A., Oliveira L., Ribeiro A., Tavares D., Trieu-Cuot P., Vilanova M., Ferreira P. // J. Immunol. 2007. V. 178. P. 1379–1387.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.3.1379>
95. Bergmann S., Rohde M., Hammerschmidt S. // Infect. Immun. 2004. V. 72. P. 2416–2419.
<https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2416-2419.2004>
96. Hannibal L., Collins D., Brassard J., Chakravarti R., Vempati R., Dorlet P., Santolini J., Dawson J.H., Stuehr D.J. // Biochemistry. 2012. V. 51. P. 8514–8529.
<https://doi.org/10.1021/bi300863a>
97. Quessy S., Busque P., Higgins R., Jacques M., Dubreuil J.D. // FEMS Microbiol. Lett. 1997. V. 147. P. 245–250.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10249.x>
98. Brassard J., Gottschalk M., Quessy S. // Vet. Microbiol. 2004. V. 102. P. 87–94.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.05.008>
99. Wang J., Li Y., Pan L., Li J., Yu Y., Liu B., Zubair M., Wei Y., Pillay B., Olaniran A.O., Chiliza T.E., Shao G., Feng Z., Xiong Q. // Vet. Res. 2021. V. 52. P. 80.
<https://doi.org/10.1186/s13567-021-00952-8>
100. Alvarez R.A., Blaylock M.W., Baseman J.B. // Mol. Microbiol. 2003. V. 48. P. 1417–1425.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03518.x>
101. Sha J., Erova T.E., Alyea R.A. // J. Bacteriol. 2009. V. 191. P. 3095–3107.
<https://doi.org/10.1128/JB.00005-09>
102. Agarwal S., Kulshreshtha P., Bambah Mukku D., Bhatnagar R. // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1784. P. 986–994.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.03.017>
103. Knaust A., Weber M.V., Hammerschmidt S., Bergmann S., Frosch M., Kurzai O. // J. Bacteriol. 2007. V. 189.

- P. 3246–3255.
<https://doi.org/10.1128/JB.01966-06>
104. Kolberg J., Aase A., Bergmann S., Herstad T.K., Rødal G., Kurzai O. // *Microbiology*. 2006. V. 152. P. 1307–1317.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.28747-0>
105. Mundodi V., Kucknoor A.S., Alderete J.F. // *Infect. Immun.* 2008. V. 76. P. 523–531.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01352-07>
106. Antikainen J., Kuparinen V., Lahteenmaki K., Korhonen T.K. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007. V. 51. P. 526–534.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00330.x>
107. Collen D., Verstraete M. // *Thromb. Diath. Haemorrh.* 1975. V. 34. P. 403–408.
108. Dano K., Andreasen P.A., Grondahl-Hansen J., Kristensen P., Nielsen L.S., Skriver L. // *Adv. Cancer Res.* 1985. V. 44. P. 139–266.
[https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60028-7](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60028-7)
109. Esgleas M., Li Y., Hancock M.A., Harel J., Dubreuil J.D., Gottschalk M. // *Microbiology*. 2008. V. 154. P. 2668–2679.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/017145-0>
110. Carneiro C.R., Postol E., Nomizo R., Reis L.F., Brentani R.R. // *Microbes Infect.* 2004. V. 6. P. 604–608.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.02.003>
111. Evers P.A., Murphy J.M. // *BMC Biol.* 2016. V. 14. P. 98.
<https://doi.org/10.1186/s12915-016-0322-x>
112. Murphy J.M., Farhan H., Evers P.A. // *Biochem. Soc. Trans.* 2017. V. 45. P. 537–544.
<https://doi.org/10.1042/BST20160400>
113. Todd A.E., Orengo C.A., Thornton J.M. // *Structure*. 2002. V. 10. P. 1435–1451.
[https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(02\)00861-4](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(02)00861-4)
114. Walden M., Masandi S.K., Pawłowski K., Zeqiraj E. // *Biochem. Soc. Trans.* 2018. V. 46. P. 453–466.
<https://doi.org/10.1042/BST20160268>
115. Pils B., Schultz J. // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 340. P. 399–404.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.04.063>
116. Jeffery C.J. // *Biochem. Soc. Trans.* 2019. V. 47. P. 371–379.
<https://doi.org/10.1042/BST20180473>
117. Brew K., Vanaman T.C., Hill R.L. // *J. Biol. Chem.* 1967. V. 242. P. 3747–3749.
118. Klee W.A., Klee C.B. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1970. V. 39. P. 833–841.
[https://doi.org/10.1016/0006-291x\(70\)90398-0](https://doi.org/10.1016/0006-291x(70)90398-0)
119. Ramakrishnan B., Qasba P.K. // *Mol. Biol.* 2001. V. 310. P. 205–218.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4757>
120. Murzin A.G. // *Science*. 2008. V. 320. P. 725–726.
<https://doi.org/10.1126/science.1158868>
121. Dishman A.F., Volkman B.F. // *Acs. Chem. Biol.* 2018. V. 13. P. 1438–1446.
<https://doi.org/10.1021/acscmbio.8b00276>
122. Lella M., Mahalakshmi R. // *Biochemistry*. 2017. V. 56. P. 2971–2984.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00375>
123. Goodchild S.C., Curmi P.M.G., Brown L.J. // *Biophys. Rev.* 2011. V. 3. P. 143.
<https://doi.org/10.1007/s12551-011-0053-8>
124. Tuinstra R.L., Peterson F.C., Kutlesa S., Elgin E.S., Kron M.A., Volkman B.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 5057–5062.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0709518105>
125. Burmann B.M., Knauer S.H., Sevostyanova A., Schweimer K., Mooney R.A., Landick R., Artsimovitch I., Rösch P. // *Cell*. 2012. V. 150. P. 291–303.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.042>
126. Goodchild S.C., Howell M.W., Littler D.R., Mandyam R.A., Sale K.L., Mazzanti M., Breit S.N., Curmi P.M., Brown L.J. // *Biochemistry*. 2010. V. 49. P. 5278–5289.
<https://doi.org/10.1021/bi100111c>
127. Luo X., Yu H. // *Structure*. 2008. V. 16. P. 1616–1625.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2008.10.002>
128. Tseng R., Goularte N.F., Chavan A., Luu J., Cohen S.E., Chang Y.G., Heisler J., Li S., Michael A.K., Tripathi S., Golden S.S., LiWang A., Partch C.L. // *Science*. 2017. V. 355. P. 1174–1180.
<https://doi.org/10.1126/science.aag2516>
129. Dai Z., Tonelli M., Markley J.L. // *Biochemistry*. 2012. V. 51. P. 9595–9602.
<https://doi.org/10.1021/bi301413y>
130. Lopez-Pelegrin M., Cerda-Costa N., Cintas-Pedrola A., Herranz-Trillo F., Bernadó P., Peinado J.R., Arolas J.L., Gomis-Rüth F.X. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014. V. 53. P. 10624–10630.
<https://doi.org/10.1002/anie.201405727>
131. London R.E. // *Structure*. 2019. V. 27. P. 420–426.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2018.11.011>
132. Peterson F.C., Elgin E.S., Nelson T.J., Zhang F., Hoeger T.J., Linhardt R.J., Volkman B.F. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 12598–12604.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M311633200>
133. Tuinstra R.L., Peterson F.C., Elgin E.S., Pelzek A.J., Volkman B.F. // *Biochemistry*. 2007. V. 46. P. 2564–2573.
<https://doi.org/10.1021/bi602365d>
134. Jaffe E.K. // *Trends Biochem. Sci.* 2005. V. 30. P. 490–497.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.07.003>
135. Jaffe E.K., Lawrence S.H. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2012. V. 519. P. 144–153.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.10.010>
136. Guo G.G., Gu M., Etlinger J.D. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 12399–12402.
137. Li X.C., Gu M.Z., Etlinger J.D. // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 9709–9715.
<https://doi.org/10.1021/bi00104a020>

Multifunctional Proteins and Their Role in the Vital Activity of Cells

D. A. Korshunov^{*, #}, E. E. Sereda^{*, **}, and I. V. Kondakova^{*}

[#]Phone: +7 (3822) 28-26-76, * 3341; e-mail: ieved@ya.ru

^{*}Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center RAS, per. Kooperativnyi 5, Tomsk, 634050 Russia

^{**}Siberian State Medical University, Moskovskii trakt 2, Tomsk, 634050 Russia

The function of a newly discovered protein is often assessed by matching its new sequence to sequences of proteins with known functions. However, protein superfamilies can contain homologous elements that catalyze different reactions. Some homologous proteins differ in that they perform a second or even a third function and are called moonlighting proteins, which can be translated as mate proteins or underwork proteins. Also, such proteins are called multifunctional. In addition to these, the superfamilies of proteins with multiple functions also include pseudoenzymes that have a common catalytically active domain but no catalytic activity, as well as metamorphs and morphheins. This review discusses examples of such proteins, their diversity of functions, and their importance in the life of the cell.

Keywords: moonlighting proteins, GAPDH, pseudoenzymes, metamorphic proteins, morphheins



АНАЛИЗ ВРЕМЕН ЖИЗНИ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ МОДЕЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ КАК ПОДХОД К ФОТОФИЗИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ¹

© 2023 г. Н. С. Балеева*, М. С. Баранов*, **, А. М. Богданов*, #

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

**Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 29.11.2022 г.

После доработки 10.12.2022 г.

Принята к публикации 12.12.2022 г.

Изучение структурно-функциональных взаимосвязей между хромофором и его белковым окружением — ключевой аспект при фотофизической инженерии флуоресцентных белков (ФБ), в частности в направленном получении их новых вариантов с высоким квантовым выходом флуоресценции (КВФ). Описаны подходы к увеличению КВФ, основанные на подавлении безызлучательных процессов в возбужденном состоянии, однако не выработан инструментальный направленный изменения константы флуоресценции (k_f), которая также выступает потенциально “настраиваемой” величиной. Мы предлагаем экспериментальный подход, в рамках которого синтетический хромофор ФБ моделирует “фиксацию” наиболее значимых безызлучательных констант и дает представление о пластичности времени жизни флуоресценции (как индикатора k_f). Для подтверждения работоспособности данного подхода мы проанализировали времяразрешенное флуоресцентное поведение аналогов хромофора зеленого и синего ФБ в разнообразном химическом окружении. Конформационно-фиксированный аналог хромофора зеленого флуоресцентного белка (GFP) в большинстве случаев показывал монофазные кинетики затухания флуоресценции со временем жизни 2.7–3.0 нс, адекватно моделируя типичное поведение GFP с наиболее высокими КВФ. В условиях же принудительной ионизации этого хромофора мы наблюдали увеличенные (до 4.3–4.6 нс) времена жизни флуоресценции, которые могут быть интерпретированы в терминах увеличения константы флуоресценции (k_f). Конформационно-фиксированный аналог хромофора Sirius показал биэкспоненциальные кинетики затухания флуоресценции, отчасти моделирующие свойства синих ФБ. В растворе уксусной кислоты это соединение проявило отличающиеся флуоресцентные свойства (интенсивную флуоресценцию с мажорной долгоживущей популяцией ~4 нс), которые можно интерпретировать как эмиссию необычной катионной формы хромофора.

Ключевые слова: флуоресцентный белок, GFP, Sirius, время жизни флуоресценции, модельный хромофор, сольватохромизм, константа флуоресценции

DOI: 10.31857/S0132342323030065, **EDN:** PDL0LW

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные белки (ФБ) из морских организмов и их разнообразные генно-инженерные

варианты формируют важный класс генетически кодируемых флуоресцентных меток с автокаталитически формирующимся хромофором [1, 2]. Оптические свойства флуорофоров этого класса детерминированы не только химическим строением их хромофора (который представляет собой производные арилиден-имидазолонов [3]), но и его белковым окружением [3–5]. Так, прямые синтетические аналоги хромофоров ФБ практически не флуоресцируют в свободном растворенном виде [6, 7] в силу преобладания безызлучательных процессов их возбужденного состояния (прежде всего, вращения вокруг арил-алкеновой связи) над излучательными. Роль белкового матрикса, однако, не сводится к фиксации хромофор-

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: dbu — диазабициклоундецен; EGFP — улучшенный зеленый флуоресцентный белок (enhanced green fluorescent protein); ESPT — перенос протона в возбужденном состоянии (excited state proton transfer); fdFLI — визуализация времени жизни флуоресценции в частотном домене (frequency domain fluorescence lifetime imaging); GFP — зеленый флуоресцентный белок; k_f — константа флуоресценции; КВФ — квантовый выход флуоресценции; ФБ — флуоресцентные белки.

Автор для связи: (тел.: +7 (903) 746-08-49; эл. почта: noobissat@ya.ru; bogdanoff@ibch.ru).

ной группы в (около)планарной конформации. Многочисленные гидрофобные и электростатические взаимодействия с хромофором аминокислотных остатков, экспонированных внутрь β -бочонка и расположенных на разном удалении от сопряженной π -электронной системы, оказывают определяющее влияние на энергетику основного и возбужденного состояний хромофора и тем самым на его спектральное своеобразие, квантовую эффективность, фотохимическую активность [4, 5, 8]. Таким образом, понимание структурно-функциональных взаимосвязей между хромофором и его белковым окружением — ключевой аспект при фотофизической инженерии ФБ, т.е. направленном получении их новых вариантов с усовершенствованными оптическими свойствами [9, 10].

Одна из центральных задач модификации ФБ — увеличение яркости их флуоресценции [5, 11]. В свою очередь, молекулярная яркость напрямую зависит от квантового выхода флуоресценции (КВФ), который базовыми уравнениями спектроскопии выражается через константы скорости релаксации возбужденного состояния хромофора:

$$\text{КВФ} = \frac{k_r}{(k_r + k_{nr})},$$

где k_r — константа скорости излучательной релаксации, k_{nr} — сумма констант всех безызлучательных процессов в возбужденном состоянии.

Для анализа структурных детерминант высокого КВФ с целью инженерии улучшенных ФБ применяется разнообразный методический арсенал [5, 12]. К его инструментам относятся молекулярное моделирование [13–16], структурный анализ [8, 17–19], направленная белковая эволюция [20, 21] и исследования изолированных хромофоров [9, 22–24]. Особенно результативным показывает себя комбинирование перечисленных подходов, позволяющее в отдельных случаях строить обобщенные модели функционирования хромофора конкретного типа [9, 10, 25]. Отметим, однако, что при всем разнообразии стратегии фотофизической инженерии ФБ предполагают в основном снижение эффективности безызлучательных процессов (т.е. уменьшение k_{nr}) [5]. В то же время не описано системных подходов к направленному изменению константы флуоресценции (k_r), которая, как свидетельствуют экспериментальные данные [26–28], также выступает переменной, потенциально “настраиваемой” величиной. Основой для исследования пластичности излучательной константы хромофора ФБ могли бы стать скрининги объемных библиотек их мутантных вариантов с анализом времени жизни флуоресценции (τ), величина которой связана с КВФ через k_r . Действительно, такой подход показал свою эффективность для поиска вариан-

тов ФБ с увеличенной яркостью [20, 29–31], но при высокой технической сложности и стоимости скринингов их информативность с точки зрения оценки константы флуоресценции, по всей видимости, невелика, поскольку разброс величин τ в данном случае детерминирован в основном лабильностью k_{nr} [5].

Мы предполагаем, что перспективной системой для изучения времен жизни флуоресценции хромофора ФБ в контексте исследования пластичности его излучательной константы выступает синтетический конформационно-фиксированный аналог этого хромофора. Если такое соединение адекватно моделирует “фиксацию” безызлучательных констант (а их вариативность, вероятно, сильно снижена), то его поведение в различном физико-химическом окружении может дать представление о пластичности константы флуоресценции (и времени жизни флуоресценции) хромофора и, соответственно, о теоретических пределах/перспективах ее последующей “настройки” в молекуле белка. Базовый методический вопрос, который мы ставили в настоящем исследовании, — соответствует ли времяразрешенное поведение конформационно-фиксированных аналогов хромофора зеленого и синего ФБ в разнообразном химическом окружении таковому у описанных в литературе генно-инженерных вариантов соответствующих белков с различающимися КВФ (прежде всего, близкими к единице). В ходе экспериментов также предстояло выяснить, наблюдаются ли в каких-либо из созданных физико-химических условий заметно увеличенные времена жизни флуоресценции (которые могли бы быть интерпретированы как увеличенные излучательные константы).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве модельных соединений мы выбрали конформационно-фиксированные аналоги хромофора зеленого флуоресцентного белка (GFP) и сине-фиолетового ФБ Sirius (рис. 1, соединения (I) и (II) соответственно). Первый был выбран как модель наиболее широкого распространения и хорошо изученного хромофора, формирующегося из трипептида состава XYG [32, 33]; второй — напротив, как пример сравнительно экзотического и слабо охарактеризованного с фотофизической точки зрения хромофора состава QFG [34]. Синтез указанных соединений был произведен в соответствии с ранее предложенными и описанными нами методиками [23, 35]. Для формирования разнообразного окружения изучаемых хромофоров был привлечен представительный (~50 наименований) набор органических растворителей. Отметим, что похожий набор мы использовали в предыдущей работе, в которой анализировали корреляции ста-

ционных и времяразрешенных свойств хромофора голубого ФБ [36].

Выбранные растворители можно разделить на шесть групп на основании их физико-химического своеобразия. Первую группу составляют алканы различного строения, которые создают липофильное окружение, не способствуют формированию электростатических взаимодействий хромофора с растворителем и слабо влияют на дипольный момент хромофора. Важно, что выбранные алканы существенно различаются по вязкости ($\eta = 0.3\text{--}3.0 \times 10^3$ Па с) и показателю преломления, а воздействие этих параметров на характер затухания флуоресценции модельных хромофоров представляет значительный интерес, поскольку обе величины влияют на время жизни флуоресценции ФБ [37–39], а квадрат показателя преломления напрямую определяет величину излучательной константы (согласно уравнению Штриклера–Берга [40]). Вторую группу растворителей формируют одноатомные спирты, которые позволяют одновременно варьировать полярность и вязкость окружения хромофора, имитируя поведение полярных и гидрофобных остатков в белковом ядре. Третья группа – ароматические растворители, моделирующие влияние на излучательную константу соседствующих с хромофором остатков фенилаланина, тирозина и триптофана. Четвертая группа – основные растворители, позволяющие изучить роль электростатических взаимодействий в хромофорном окружении (в частности, смоделировать влияние на поведение хромофора остатков аргинина или лизина), влияющие на дипольный момент хромофора. К пятой группе относятся полярные растворители, которые имитируют соответствующие аминокислотные остатки и позволяют оценивать влияние полярного окружения на кинетику затухания флуоресценции отдельно от вязкости/показателя преломления. Наконец, шестую группу составляют специальные галогеносодержащие растворители, которые моделируют экстремально липофильное окружение хромофора, а также (в случае хлор- и бром-производных) позволяют изучать действие на затухание флуоресценции соседних с хромофором тяжелых атомов. Такое окружение хромофора может быть реализовано, например, в ФБ с неканоническими галогенированными аминокислотными остатками в окружении хромофора [41, 42].

Систематический анализ времяразрешенного флуоресцентного поведения модельных соединений мы начали с конформационно-фиксированного аналога хромофора GFP (рис. 1, соединение (I)). Ввиду значительного числа экспериментальных образцов мы приняли решение измерять кинетику затухания флуоресцентного сигнала разработанным нами высокопроизводительным методом с использованием макроимиджера, детектирующего времена жизни в частотном домене (frequency do-

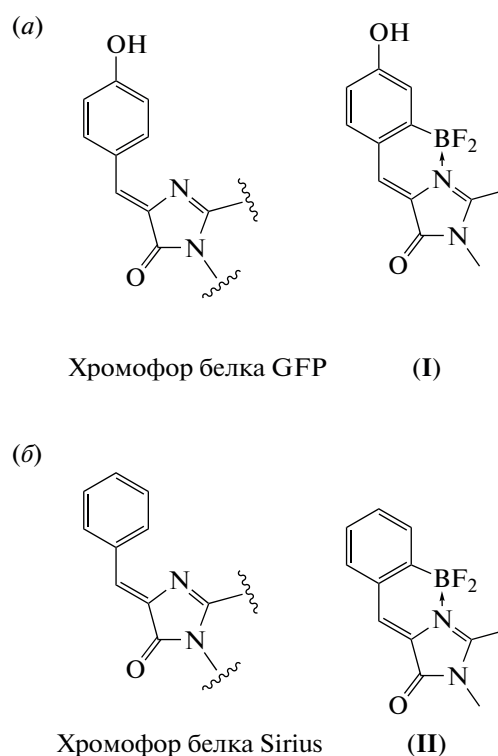


Рис. 1. Структуры хромофоров флуоресцентных белков и их синтетических аналогов: (а) – хромофор белка GFP и его конформационно-фиксированный аналог (соединение (I)); (б) – хромофор белка Sirius (слева) и его конформационно-фиксированный аналог (соединение (II)).

main fluorescence lifetime imaging, fdFLI). В результате удалось зарегистрировать сигналы высокого качества в большинстве растворов (табл. 1).

Все измеренные кинетики отличались гомогенностью флуоресцентных популяций и исключительно монофазным характером затухания (так, фазовые и модуляционные времена жизни, τ_f и τ_m , практически совпадали в большинстве измерений; в этой связи в табл. 1 для краткости мы приводим только значение τ_m). Наиболее значимое наблюдение по итогам эксперимента состояло в том, что время жизни флуоресценции конформационно-фиксированного GFP колебалось в сравнительно узком диапазоне 2.7–3.0 нс, не проявляя выраженной зависимости от свойств растворителя (полярности, вязкости, показателя преломления). Анализ крупнейшей базы данных физико-химических свойств ФБ FPbase [43] показал, что наиболее яркие зеленые флуоресцентные белки с хромофором состава XYG (прототип изучаемого здесь синтетического хромофора) обладают схожими кинетиками затухания флуоресценции. Так, популярный белок EGFP (КВФ ~ 0.6) имеет $\tau = 2.6\text{--}2.8$ нс [26], у белка Clover (КВФ ~ 0.76) $\tau = 3.2$ нс [44], а у наиболее ярко-

Таблица 1. Времена жизни флуоресценции конформационно-фиксированного аналога хромофора белка GFP в различных растворителях

Растворитель	Время жизни флуоресценции, нс	Растворитель	Время жизни флуоресценции, нс
Ацетонитрил	2.95	Дихлорэтан	2.84
Этилацетат	2.86	Дихлорметан	2.92
Диэтиловый эфир	2.82	Триэтиламин	—
Диметилацетамид	2.82	Тетраметилэтилендиамин (TMEDA)	—
Диоксан	2.86	<i>N</i> -Этилморфолин	—
Метилэтилкетон	2.85	Трифторэтанол	3.38
Циклогексанон	2.82	Октанол-2	2.91
<i>N</i> -Метилпирролидон	—	Тетрагидрофуран	2.82
Диметилсульфоксид	2.66	Хлороформ	2.88
Уксусная кислота	3.01	Дихлорбензол	2.70
Октан	—	Хлорбензол	2.69
Метанол	3.02	Бензол	2.71
Этанол	2.95	Толуол	2.63
Пропанол-1	2.82	Пиридин	2.82
Бутанол-1	2.93	Ундеканол-1	2.83
Гексанол-1	2.92	Пентанол-1	2.95
Деканол-1	2.89	Нитрометан	0.98
Додеканол-1	2.85	<i>Трет</i> -бутанол	3.04
Изоамиловый спирт	2.77	Циклогексанол	2.74
Изопропанол	2.71	Дибромметан	2.67
Бутанол-2	2.85	Метоксифторбутан	2.89

Примечание: прочерк — слишком слабая флуоресценция для детекции достоверного сигнала. Полужирным шрифтом выделены растворители, в которых зарегистрированы наиболее короткие и длинные времена жизни флуоресценции модельного соединения.

го из известных GFP mNeonGreen (КВФ ~ 0.8) $\tau = 3.1$ нс [45]. Фактически заметное отклонение от среднего значения времени жизни наблюдалось лишь в экстремально липофильном трифторэтаноле (~ 3.4 нс) и в нитрометане (~ 1 нс). Мы полагаем, что в последнем случае наблюдается гашение флуоресценции за счет протекания в этом растворителе конкурентного безызлучательного процесса, переноса электрона возбужденного состояния на растворитель [46].

В целом результаты этого эксперимента свидетельствуют о том, что времяразрешенное поведение модельного соединения хорошо соответствует таковому у описанных ранее зеленых ФБ с высоким КВФ, а значит, наши методические предпосылки (о “фиксации” безызлучательных констант) верны. Вместе с тем мы усомнились, что наблюдаемые колебания времен жизни отражают полный диапазон изменения константы флуоресценции модельного соединения. Возможно, в значительной части растворителей испускание конформационно-фиксированного хромофора GFP происходит через перенос протона в возбужденном

состоянии (ESPT) [47], т.е. из нейтральной формы хромофора с существенной потерей части энергии возбуждения. В этой связи мы дополнительно изучили поведение принудительно ионизованного модельного соединения (**I**) в части растворителей.

Для дополнительного эксперимента были взяты растворы конформационно-фиксированного хромофора GFP в химическом окружении, имитирующем важнейшие условия, реализующиеся внутри молекулы ФБ (табл. 2). Ко всем растворителям перед измерениями добавляли диазабициклоундецен (dbu) — сильное органическое основание, обеспечивающее ионизацию хромофора. Таким образом, в этом случае мы анализировали исключительно прямую флуоресценцию из анионной формы хромофора, которая служит основным источником эмиссии практически значимых вариантов GFP. В этом эксперименте мы предпочли использовать для измерения кинетик затухания флуоресценции времяразрешенную спектрометрию с времякоррелированным счетом фотонов. Это менее производительный, но более высоко-

Таблица 2. Анализ кинетики затухания анионного хромофора GFP в растворителях основных классов (+ 0.05% dbu)

Растворитель	Число компонент	Время жизни флуоресценции, нс (вклад, %)*
Трифторэтанол	1	4.3
Изопропанол	1	4.0
Этилацетат	1	3.35
Диметилформамид	2	2.30 (21), 4.67 (68)
Диметилсульфоксид	2	2.35 (59), 4.2 (34)
Ацетонитрил	2	1.70 (32), 3.10 (63)
Хлороформ	1	3.94
Диоксан	2	1.26 (18), 3.43 (54)
Пиридин	2	1.24 (28), 3.6 (36)
Метанол	1	3.89
Толуол	1	3.10

* Указаны только относительные вклады (%) компонент затухания флуоресценции, относящиеся к изучаемому веществу. Вклад короткоживущих компонент, относящихся к аппаратной функции, не показан (по этой причине для двухкомпонентных кинетик сумма амплитуд значимых флуоресцентных компонент, как правило, менее 100%).

разрешающий метод флуоресцентного анализа, позволяющий, в частности, адекватнее характеризовать многокомпонентные затухания и выявлять возможные признаки протекания безызлучательных процессов в возбужденном состоянии.

Как и в предыдущем эксперименте, флуоресценция хромофора GFP демонстрировала преимущественно моноэкспоненциальную кинетику затухания, однако характерные времена жизни здесь оказались существенно выше, находясь в диапазоне 3.1–4.3 нс и достигая 4.67 нс у отдельных флуоресцентных популяций (табл. 2). С известной долей осторожности этот результат можно интерпретировать в терминах пластичности излучательной константы хромофора GFP. Иными словами, можно ожидать получения вариантов зеленых ФБ с хромофором состава XYG и временем жизни флуоресценции 4.0–4.5 нс. Природа гетерогенности флуоресцентной популяции в некоторых типах окружения (биэкспоненциальное затухание флуоресценции в диоксане, пиридине, диметилформамиде и пр.) остается неясной и требует дополнительных исследований, выходящих за рамки данной работы.

Для конформационно-фиксированного аналога хромофора синего флуоресцентного белка Sirius (рис. 1, соединение (II)) попытки времяразрешенного флуоресцентного анализа высокопроизводительным методом fdFLI оказались неудачными. Мы связываем неудовлетворительное качество сигнала с двумя факторами: сравнительно плохой растворимостью модельного соединения и неоптимальным режимом возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{ex}} \sim 400$ нм), диктуемым конфигурацией установки. Однако методом спектрометрии с времякоррелированным счетом фотонов нам

удалось проанализировать наносекундные кинетики затухания флуоресценции этого флуорофора в большинстве выбранных растворителей (табл. 3). Измерения показывают, что флуоресценция Sirius характеризуется двухкомпонентным затуханием с характерными временами $\tau_1 \sim 2.0\text{--}2.8$ нс и $\tau_2 \sim 6.0\text{--}8.5$ нс (табл. 3). В целом оказалось затруднительным выявить выраженные закономерности зависимости времен жизни и амплитуд флуоресцентных популяций от свойств растворителя, однако наблюдается некоторая тенденция к увеличению времени жизни и вклада долгоживущей компоненты (τ_2) в гидрофобных неполярных вязких растворителях (например, додекане, пентадекане, гексадекане). Важно отметить, что флуоресцентная кинетика ФБ Sirius в литературе не описана, а близкие по стационарным спектральным свойствам синие флуоресцентные белки (EBFP, TagBFP) характеризуются монофазным затуханием флуоресценции со временами жизни 2.5–3.2 нс [43, 48], которые хорошо соответствуют таковым для короткоживущей (τ_1) формы хромофора Sirius (рис. 1, соединение (II)).

Интерпретировать долгоживущую флуоресцентную форму модельного соединения (τ_2) можно двояко. С одной стороны, привлекательной представляется гипотеза, что данная флуоресцентная форма соответствует субпопуляции хромофора с повышенной излучательной константой, и что полурациональное введение в хромофорное окружение ФБ Sirius неполярных (лейцин, изолейцин) и/или длинноцепочечных слабополярных (аргинин) аминокислотных остатков могло бы способствовать доминированию этой флуоресцентной формы в белке (что сделало бы соответствующий

Таблица 3. Анализ кинетики затухания конформационно-фиксированного аналога хромофора Sirius в растворителях разных классов

Растворитель	Хромофор Sirius, время жизни флуоресценции*			
	τ_1 , нс	A1, %	τ_2 , нс	A2, %
Гексанол-1	2.44	36	7.00	44
Пентанол-1	2.60	48.5	7.00	29.5
Циклогексанон	2.48	40	7.43	42
Циклогексанол	2.57	40	7.25	26
Изоамиловый спирт	2.18	51	6.70	28
Трет-бутанол	—	—	—	—
2-Метилбутанол-2	2.35	37	7.06	47
Бутанол-1	2.49	32	7.47	50
Бутанол-2	2.78	53	6.73	38
Октанол-1	2.80	45	7.78	50
Изобутиловый спирт	2.63	39	8.14	32
Трифторэтанол	2.85	37	6.25	34
Ундеканол-1	2.53	33	7.60	38
Додеканол-1	2.52	49	6.29	21
Нитробензол	2.26	25	8.50	11
Диизопропилэтиламин	2.35	57	6.98	27
Изопропанол	2.72	28	6.76	50
Этанол	2.60	26	7.75	38
Октанол-2	2.80	48	7.65	45
Деканол-1	2.45	29	7.93	33
Пропанол-1	2.46	29	8.04	40
Этилацетат	2.62	33	7.60	52
Диметилформамид	1.90	34	6.05	39
Тетрагидрофуран	2.66	33	7.90	44
Диэтиловый эфир	2.70	36	7.94	57
Дихлорметан	2.10	33.5	6.78	54.5
Диметилацетамид	2.28	35	6.13	50
Диметилсульфоксид	2.27	35	6.35	47
Ацетонитрил	2.83	65	6.37	21
Хлороформ	2.79	47	6.87	42
Диоксан	2.80	33	8.57	54
Октан	2.63	39	7.40	45
Пентадекан	2.60	35	8.40	52
Гексадекан	2.60	33	8.55	51
Декан	2.50	33	7.72	52
Уксусная кислота	1.20	31	4.02	64
Гексан	2.48	33.5	7.24	54.5
Додекан	2.70	34	8.37	49
Дихлорэтан	2.76	39	7.57	45
Нитрометан	2.25	35	6.39	20
Метилэтилкетон	2.50	45	6.83	42
Триэтиламин	2.23	29	6.25	52
N-Метилпирролидон	2.56	27	8.86	68
Дибромметан	2.50	38	6.13	46
Пиридин	2.21	35	6.16	43.5
Метанол	2.20	30	7.43	34
Толуол	2.55	33	7.17	51
Хлорбензол	2.85	42	7.82	45
Дихлорбензол	2.74	37	7.80	56
Бензол	2.68	39	6.94	43
Метоксиперфторбутан	2.84	33	6.24	35

* Указаны только амплитуды (A), или относительные вклады компонент затухания флуоресценции, относящиеся к изучаемому веществу. Вклад идентичных для всех измерений короткоживущих компонент, относящихся к аппаратной функции, не показан (по этой причине сумма амплитуд значимых флуоресцентных компонент, как правило, менее 100%).

вариант Sirius ценной меткой для времяразрешенной микроскопии). С другой стороны, экспериментальное подтверждение находит предположение, что происхождение τ_2 связано с (авто)флуоресценцией растворителя, которая в условиях плохой растворимости модельного соединения сравнима по амплитуде с сигналом последнего.

Интересно, что мы выявили аномальное поведение хромофора Sirius в уксусной кислоте — bathochromный сдвиг максимума эмиссии (данные не приведены) и существенно укороченные времена жизни обоих флуоресцентных компонент этого флуорофора ($\tau_1 = 1.2$ нс (31%), $\tau_2 = 4.02$ нс (64%)). При этом интенсивность сигнала (средний счет фотонов при заданной мощности источника возбуждения) была практически на 2 порядка величины выше, чем в других условиях (вероятно, за счет существенно лучшей растворимости модельного соединения (II)). Можно предположить, что в уксусной кислоте мы наблюдаем флуоресценцию катионной формы хромофора [49, 50], а введение в хромофорное окружение ФБ Sirius сильно полярных и электрически заряженных аминокислотных остатков способно привести к похожему эффекту.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез модельных соединений (I) и (II). Синтез модельных соединений (I) и (II) проводили согласно методикам, разработанным ранее [23, 35]. На первом этапе были получены хромофоры-предшественники без конформационной фиксации (не флуоресцирующие в растворе). Для синтеза предшественников хромофоров типа GFP и Sirius использовали подход, связанный с применением имидатов, получаемых из ацетонитрила и эфира глицина. На втором этапе синтеза с помощью последовательного действия трибромид бора и плавиковой кислоты хромофоры-предшественники были превращены в конформационно-фиксированные аналоги (флуоресцирующие в растворе).

Подготовка растворителей. Всего для целей исследования было подготовлено 63 органических растворителя, относящихся к шести группам по физико-химическим свойствам.

Алканы были представлены гексаном, октаном, додеканом, пентадеканом и гексадеканом. Растворители этой группы были очищены перегонкой над гидридом кальция для удаления следов влаги и продуктов окисления.

Спирты были представлены изопропанолом, бутанолом-2, октанолом-2, циклогексанолом, 2-метил-бутанолом-2, *трет*-бутанолом, бутанолом-2, метанолом, этанолом, пропанолом-1, бутанолом-1, пентанолом-1, гексанолом-1, октанолом-1, деканолом-1, ундеканолом-1, додеканолом-1, изоамиловым спиртом и изобутанолом.

Растворители этой группы также были очищены перегонкой над гидридом кальция для удаления следов влаги и продуктов возможного окисления.

Ароматические растворители были представлены дихлорбензолом, хлорбензолом, бензолом, толуолом, крезолом и мезитилом. Растворители этой группы дополнительно не очищали, поскольку они были коммерчески доступны в вариантах с высокой степенью очистки.

Основные растворители были представлены триэтиламином, пиридином, тетраметилэтилендиамином, этилморфолином, диизопропиламином, этилдиизопропиламином, бутиламином и анилином. Некоторые из этих растворителей были коммерчески доступны в вариантах с высокой степенью очистки, а другие подготовлены с помощью перегонки над гидридом кальция.

Полярные растворители были представлены ацетонитрилом, ацетоном, этилацетатом, диэтиловым эфиром, тетрагидрофураном, диметилформамидом, диметилацетамидом, диоксаном, метилэтилкетон, циклогексаном, *N*-метилпирролидоном, диметилсульфоксидом, уксусной кислотой и нитрометаном. Некоторые из этих растворителей были коммерчески доступны в вариантах с высокой степенью очистки, а другие подготовлены с помощью перегонки над гидридом кальция.

Специальные (экстремально липофильные) растворители были представлены трифторэтанолом, метилперфторбутиловым эфиром, перфторбензолом, перфтортолуолом, фторацетоном, фторпропанолом, фторпентанолом, дибромметаном, хлороформом, дихлорэтаном и дихлорметаном. Растворители этой группы дополнительно не очищали, поскольку они были коммерчески доступны в вариантах с высокой степенью очистки.

Для ионизации хромофора GFP добавляли в растворитель диазабициклоундецен (dbu) в количестве 0.05% по объему.

Визуализация времени жизни флуоресценции в частотном домене. Измерение времен жизни флуоресценции нейтральной формы конформационно-фиксированного хромофора GFP производили путем последовательной флуоресцентной визуализации по 4–5 образцов в режиме анализа времени жизни флуоресценции в частотном домене (frequency domain fluorescence lifetime imaging) на модифицированной для визуализации макрообъектов установке, основанной на fdFLIM-системе LIFA (Lambert Instruments, Нидерланды). Для возбуждения флуоресценции использовали импульсные источники модулированного излучения из набора Multi-LED (Lambert Instruments, Нидерланды; $\lambda = 407$ и 471 нм, частота повторения импульсов 20 и 40 МГц, в зависимости от интенсивности флуоресценции конкретного образ-

ца). Для детекции сигнала использовали камеру Toggel (Lambert Instruments, Нидерланды) с присоединенным к ней светосильным фотообъективом 50–100/1.8 (Sigma, Япония), снабженным эмиссионным фильтром HQ510lp (Chroma, США). Калибровку системы проводили с помощью калибровочного образца “зеленая акриловая пластина” ($\tau = 4.2$ нс) из набора FSK5 (Thorlabs, США). Настройку режима детекции (время экспозиции, частоту повторения импульсов, число фаз и число повторений) и математическую обработку данных производили с помощью программы LIFA Tau Software 1.2.0 (Lambert Instruments, Нидерланды).

Времяразрешенная флуоресцентная спектроскопия. Времяразрешенный флуоресцентный сигнал ионизованного хромофора GFP и хромофора Sirius детектировали во временном домене (time domain fluorescence lifetime spectroscopy) методом времякоррелированного счета фотонов. Измерения производили с помощью времяразрешенного флуоресцентного спектрометра miniTau (Edinburgh Instruments, Великобритания) в кварцевой флуориметрической кювете (объем образца ~ 1 мл) во временном окне 50 нс, разделенном на 2048 временных каналов. Возбуждение флуоресценции производили пикосекундными лазерами EPL-375 (для Sirius) и EPL-450 (для GFP) (Edinburgh Instruments, Великобритания) с центральной длиной волны излучения 372 и 445.6 нм соответственно, частотой повторений 20 МГц; счет фотонов осуществляли в спектральном диапазоне 425–475 нм (Sirius) и 475–525 нм (GFP). Обработку и визуализацию данных, определение χ^2 (критерий Пирсона) проводили в программе Fluoracle 2.5.1 (Edinburgh Instruments, Великобритания).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализировано времяразрешенное флуоресцентное поведение аналогов хромофора зеленого и синего ФБ в разнообразном химическом окружении – в среде органических растворителей шести групп. Конформационно-фиксированный аналог хромофора GFP (прототипом которого служит планарный хромофор ФБ состава XYG) в большинстве случаев показывал кинетики затухания флуоресценции, чрезвычайно близкие к таковым у представителей семейства GFP с наиболее высокими КВФ, адекватно моделируя типичное поведение последних. В условиях же принудительной ионизации, снижающей потери энергии возбужденного состояния хромофора на ESPT, мы наблюдали увеличенные (до 4.3–4.6 нс) времена жизни флуоресценции, которые могут быть интерпретированы в терминах увеличения константы флуоресценции (k_f). Конформационно-фиксированный аналог хромофора Sirius (прототип – нейтральный хромофор необычного

состава QFG) показал биэкспоненциальные кинетики затухания флуоресценции, короткоживущая компонента которых похожа на родственные синие ФБ. В растворе уксусной кислоты, однако, модельное соединение проявило нетипичное фотоповедение (интенсивную флуоресценцию с мажорной популяцией $\tau \sim 4$ нс), которое можно интерпретировать как эмиссию катионной формы хромофора.

В целом реализованный экспериментальный подход, в рамках которого синтетический конформационно-фиксированный хромофор ФБ моделирует “фиксацию” наиболее значимых безызлучательных констант и дает понятие о пластичности времени жизни флуоресценции (как индикатора излучательной константы), представляется нам перспективным. Данный подход может использоваться в фотофизической инженерии ФБ для предварительной оценки пределов “настройки” времен жизни флуоресценции, которые можно ожидать от белков с конкретным типом хромофора.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-14-00255).

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. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Physiol. Rev.* 2010. V. 90. P. 1103–1163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>
2. Lukyanov K.A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022. V. 633. P. 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.08.089>
3. Zimmer M. // *Chem. Rev.* 2002. V. 102. P. 759–781. <https://doi.org/10.1021/cr010142r>
4. Maddalo S.L., Zimmer M. // *Photochem. Photobiol.* 2006. V. 82. P. 367–372. <https://doi.org/10.1562/2005-04-11-RA-485>
5. Mukherjee S., Jimenez R. // *J. Phys. Chem. B.* 2022. V. 126. P. 735–750. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c05629>
6. Dong J., Solntsev K.M., Poizat O., Tolbert L.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 10084–10085. <https://doi.org/10.1021/ja073622u>

7. Wu L., Burgess K. // J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130. P. 4089–4096.
<https://doi.org/10.1021/ja710388h>
8. Drobizhev M., Callis P.R., Nifosi R., Wicks G., Stoltzfus C., Barnett L., Hughes T.E., Sullivan P., Rebane A. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 13223.
<https://doi.org/10.1038/srep13223>
9. Lin C.-Y., Romei M.G., Oltrogge L.M., Mathews I.I., Boxer S.G. // J. Am. Chem. Soc. 2019. V. 141. P. 15250–15265.
<https://doi.org/10.1021/jacs.9b07152>
10. Lin C.-Y., Boxer S.G. // J. Am. Chem. Soc. 2020. V. 142. P. 11032–11041.
<https://doi.org/10.1021/jacs.0c02796>
11. Bajar B.T., Wang E.S., Lam A.J., Kim B.B., Jacobs C.L., Howe E.S., Davidson M.W., Lin M.Z., Chu J. // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 20889.
<https://doi.org/10.1038/srep20889>
12. Duwé S., Dedeccker P. // Curr. Opin. Biotechnol. 2019. V. 58. P. 183–191.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.04.006>
13. Olsen S., Smith S.C. // J. Am. Chem. Soc. 2007. V. 129. P. 2054–2065.
<https://doi.org/10.1021/ja066430s>
14. Faraji S., Krylov A.I. // J. Phys. Chem. B. 2015. V. 119. P. 13052–13062.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b07724>
15. Park J.W., Rhee Y.M. // J. Am. Chem. Soc. 2016. V. 138. P. 13619–13629.
<https://doi.org/10.1021/jacs.6b06833>
16. Simine L., Lammert H., Sun L., Onuchic J.N., Rossky P.J. // J. Am. Chem. Soc. 2018. V. 140. P. 1203–1206.
<https://doi.org/10.1021/jacs.7b10851>
17. Goedhart J., von Stetten D., Noirclerc-Savoye M., Lelimosin M., Joosen L., Hink M.A., van Weeren L., Gadella T.W.J., Jr., Royant A. // Nat. Commun. 2012. V. 3. P. 751.
<https://doi.org/10.1038/ncomms1738>
18. Bourgeois D. // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. P. 1187.
<https://doi.org/10.3390/ijms18061187>
19. Prangma J.C., Molenaar R., van Weeren L., Bindels D.S., Haarbosch L., Stouthamer J., Gadella T.W.J., Subramaniam V., Vos W.L., Blum C. // J. Phys. Chem. B. 2020. V. 124. P. 1383–1391.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b10396>
20. Manna P., Hung S.-T., Mukherjee S., Friis P., Simpson D.M., Lo M.N., Palmer A.E., Jimenez R. // Integr. Biol. (Camb.). 2018. V. 10. P. 516–526.
<https://doi.org/10.1039/c8ib00103k>
21. Mukherjee S., Manna P., Hung S.-T., Vietmeyer F., Friis P., Palmer A.E., Jimenez R. // J. Phys. Chem. B. 2022. V. 126. P. 4659–4668.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c01956>
22. Yan W., Zhang L., Xie D., Zeng J. // J. Phys. Chem. B. 2007. V. 111. P. 14055–14063.
<https://doi.org/10.1021/jp0756202>
23. Baranov M.S., Lukyanov K.A., Borissova A.O., Shamir J., Kosenkov D., Slipchenko L.V., Tolbert L.M., Yampolsky I.V., Solntsev K.M. // J. Am. Chem. Soc. 2012. V. 134. P. 6025–6032.
<https://doi.org/10.1021/ja3010144>
24. Mo G.C.H., Posner C., Rodriguez E.A., Sun T., Zhang J. // Nat. Commun. 2020. V. 11. P. 1848.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15687-x>
25. Conyard J., Heisler I.A., Chan Y., Bulman Page P.C., Meech S.R., Blancafort L. // Chem. Sci. 2018. V. 9. P. 1803–1812.
<https://doi.org/10.1039/c7sc04091a>
26. Mamontova A.V., Solov'yev I.D., Savitsky A.P., Shakhov A.M., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M. // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 13224.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-31687-w>
27. Sen T., Mamontova A.V., Titelmayer A.V., Shakhov A.M., Astafiev A.A., Acharya A., Lukyanov K.A., Krylov A.I., Bogdanov A.M. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 5229.
<https://doi.org/10.3390/ijms20205229>
28. Mamontova A.V., Shakhov A.M., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M. // Biomolecules. 2020. V. 10. P. 1547.
<https://doi.org/10.3390/biom10111547>
29. Bindels D.S., Haarbosch L., van Weeren L., Postma M., Wiese K.E., Mastop M., Aumonier S., Gotthard G., Royant A., Hink M.A., Gadella T.W.J., Jr. // Nat. Methods. 2017. V. 14. P. 53–56.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4074>
30. Bindels D.S., Postma M., Haarbosch L., van Weeren L., Gadella T.W.J., Jr. // Nat. Protoc. 2020. V. 15. P. 450–478.
<https://doi.org/10.1038/s41596-019-0250-7>
31. Mukherjee S., Hung S.-T., Douglas N., Manna P., Thomas C., Ekrem A., Palmer A.E., Jimenez R. // Biochemistry. 2020. V. 59. P. 3669–3682.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00484>
32. Heim R., Cubitt A.B., Tsien R.Y. // Nature. 1995. V. 373. P. 663–664.
<https://doi.org/10.1038/373663b0>
33. Ormö M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J. // Science. 1996. V. 273. P. 1392–1395.
<https://doi.org/10.1126/science.273.5280.1392>
34. Tomosugi W., Matsuda T., Tani T., Nemoto T., Kotera I., Saito K., Horikawa K., Nagai T. // Nat. Methods. 2009. V. 6. P. 351–353.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1317>
35. Baleeva N.S., Tsarkova A.S., Baranov M.S. // Tet. Lett. 2016. V. 57. P. 3043–3045.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.06.006>
36. Богданов А.М., Горбачев Д.А., Зайцева Э.Р., Смирнов А.Ю., Балева Н.С. // Биоорг. химия. 2021. Т. 47. С. 413–416. [Bogdanov A.M., Gorbachev D.A., Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Baleeva N.S., Baranov M.S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 784–787.]
<https://doi.org/10.31857/S0132342321030040>
37. Borst J.W., Hink M.A., van Hoek A., Visser A.J.W.G. // J. Fluoresc. 2005. V. 15. P. 153–160.
<https://doi.org/10.1007/s10895-005-2523-5>
38. van Manen H.-J., Verkuijlen P., Wittendorp P., Subramaniam V., van den Berg T.K., Roos D., Otto C. // Biophys. J. 2008. V. 94. P. L67–L69.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.127837>
39. Suhling K., Siegel J., Phillips D., French P.M.W., Lévêque-Fort S., Webb S.E.D., Davis D.M. // Biophys. J. 2002. V. 83. P. 3589–3595.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75359-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75359-9)

40. Strickler S.J., Berg R.A. // *J. Chem. Phys.* 1962. V. 37. P. 814–822.
<https://doi.org/10.1063/1.1733166>
41. Seifert M.H.J., Ksiazek D., Azim M.K., Smialowski P., Budisa N., Holak T.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. P. 7932–7942.
<https://doi.org/10.1021/ja0257725>
42. Liu C.C., Schultz P.G. // *Annu. Rev. Biochem.* 2010. V. 79. P. 413–444.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.105824>
43. Lambert T.J. // *Nat. Methods.* 2019. V. 16. P. 277–278.
<https://doi.org/10.1038/s41592-019-0352-8>
44. Lam A.J., St-Pierre F., Gong Y., Marshall J.D., Cranfill P.J., Baird M.A., McKeown M.R., Wiedenmann J., Davidson M.W., Schnitzer M.J., Tsien R.Y., Lin M.Z. // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. P. 1005–1012.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2171>
45. Shaner N.C., Lambert G.G., Chamma A., Ni Y., Cranfill P.J., Baird M.A., Sell B.R., Allen J.R., Day R.N., Israelsson M., Davidson M.W., Wang J. // *Nat. Methods.* 2013. V. 10. P. 407–409.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2413>
46. Yandell M.A., King S.B., Neumark D.M. // *J. Chem. Phys.* 2014. V. 140. P. 184317.
<https://doi.org/10.1063/1.4875021>
47. Chattoraj M., King B.A., Bublitz G.U., Boxer S.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 8362–8367.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8362>
48. Subach O.M., Gundorov I.S., Yoshimura M., Subach F.V., Zhang J., Grünwald D., Souslova E.A., Chudakov D.M., Verkhusha V.V. // *Chem. Biol.* 2008. V. 15. P. 1116–1124.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.08.006>
49. Grigorenko B.L., Polyakov I.V., Savitsky A.P., Nemukhin A.V. // *J. Phys. Chem B.* 2013. V. 117. P. 7228–7234.
<https://doi.org/10.1021/jp402149q>
50. Yang L., Nian S., Zhang G., Sharman E., Miao H., Zhang X., Chen X., Luo Y., Jiang J. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 11640.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-47660-0>

Fluorescence Decay Analysis of the Model Compounds as an Approach to Photophysical Engineering of Fluorescent Proteins

N. S. Baleeva*, M. S. Baranov*, **, and A. M. Bogdanov*, #

#Phone: +7 (903) 746-08-49; e-mail: noobissat@ya.ru; bogdanoff@ibch.ru

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

**Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

Studying of structure–function relationships between a chromophore and its protein environment plays a key role in photophysical engineering of fluorescent proteins (FPs), specifically, in the guided designing of their new variants with a higher fluorescence quantum yield (FQY). Known approaches to FQY increasing mostly rely on suppression of the excited state nonradiative processes, but no tools have been suggested for the tuning of the radiative rate constant (k_r), which is also a potentially “adjustable” value. Here, we propose an experimental approach in which the synthetic chromophore of FP models the “fixation” of the most important radiationless constants and allows monitoring of the fluorescence lifetime flexibility (as an indicator of the k_r value). As a proof-of-concept, we studied the time-resolved fluorescence behavior of the green and blue FP chromophore analogs in diverse chemical environments. The conformationally locked analog of the GFP chromophore in most cases showed monophasic fluorescence decay kinetics with a lifetime of 2.7–3.0 ns, thus adequately modeling the typical behavior of GFPs with the highest FQYs. Under the conditions of stimulated ionization of this chromophore, we observed increased (up to 4.3–4.6 ns) fluorescence lifetimes, which can be interpreted in terms of an increase in the radiative constant (k_r). The conformationally locked analog of the Sirius chromophore showed biexponential fluorescence decay kinetics, partly simulating the properties of the blue FPs. In an acetic acid solution, this compound exhibited distinct fluorescent properties (elevated fluorescence intensity with a major lifetime population of ~4 ns), which can be interpreted as the emission of an unusual cationic form of the chromophore.

Keywords: fluorescent protein, GFP, Sirius, fluorescence lifetime, model chromophore, solvatochromism, radiative rate constant



ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА Fab-ФРАГМЕНТА МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА LNKВ-2 С АНТИГЕННЫМ НОНАПЕПТИДОМ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА¹

© 2023 г. Е. А. Горячева*, #, И. В. Артемьев*, Н. В. Плетнева*, В. З. Плетнев*

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

Поступила в редакцию 27.06.2022 г.

После доработки 09.08.2022 г.

Принята к публикации 12.08.2022 г.

Рентгеноструктурным методом при разрешении 2.6 Å установлена пространственная структура антигенсвязывающего фрагмента (Fab) моноклонального антитела LNKВ-2 в комплексе с синтетическим антигенным нонапептидом интерлейкина-2 человека (IL-2; Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-O) в кристаллической пространственной группе P2₁2₁2₁. Пептид принимает несколько искаженную α-спиральную конформацию, близкую к таковой фрагмента 64–72 антигена IL-2. Четыре из шести гипервариабельных петель антигенсвязывающего сайта Fab-фрагмента участвуют в связывании нонапептида посредством водородных связей, солевых мостиков и гидрофобных взаимодействий, причем важную роль в распознавании антигена играют остатки Туг антитела.

Ключевые слова: моноклональное антитело, Fab-фрагмент, антиген интерлейкина-2, пространственная структура, рентгеноструктурный анализ

DOI: 10.31857/S0132342323010098, EDN: GFDHXS

ВВЕДЕНИЕ

Моноклональные антитела широко используются в биомедицинских исследованиях. Они обладают уникальной специфичностью к антигену за счет пространственной комплементарности в контактной области с образованием системы стабилизирующих водородных связей, солевых мостиков, электростатических и гидрофобных взаимодействий [1–3]. Информация о строении комплексов антител с белками и отдельными эпитопами вызывает значительный практический интерес. Изучение структурных основ специфичности связывания антиген–антитело внесло важный вклад в понимание механизма иммунного узнавания и рационального дизайна синтетических вакцин. Развитию этой области в значительной степени способствовали рентгеноструктурные исследования изолированных антител и антигенов, а также их комплексов [4].

Интерлейкин-2 (IL-2) человека — один из главных регуляторов иммунной системы, отвечающий за рост и дифференцировку активированных антигеном Т- и В-лимфоцитов [5, 6], он рассматривается как перспективное терапевтическое средство при вторичных иммунодефицитах. Моноклональное антитело LNKВ-2 относится к классу иммуноглобулинов IgG1 и взаимодействует с IL-2 с высокой аффинностью, характеризующейся величиной константы связывания $\sim 3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ [7]. Структурные исследования специфики межмолекулярного взаимодействия в комплексах антиген–антитело выступают одним из важных направлений иммунологии.

Ранее были опубликованы результаты рентгеноструктурных исследований свободного Fab-фрагмента моноклонального антитела LNKВ-2 к IL-2 человека в кристаллической пространственной группе P2₁2₁2₁ [8, 9], а также его комплекса с синтетическим 9-членным антигенным пептидом (64–72) IL-2 в пространственной группе P2₁ при разрешении 3 Å [10]. В настоящей работе приведены результаты рентгеноструктурного изучения аналогичного комплекса с антигенным нонапептидом IL-2 в новой пространственной группе P2₁2₁2₁ при более высоком разрешении 2.6 Å.

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: Fab — антигенсвязывающий фрагмент; IL-2 — интерлейкин-2; RMSD — среднеквадратичное отклонение.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-75-10; эл. почта: goryacheva@ibch.ru).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пространственная организация. Пространственная структура Fab-фрагмента LNKВ-2 сформирована из четырех β -структурных доменов — двух вариабельных (V_L и V_H) и двух константных (C_L и C_H), образованных легкой (L) и частью тяжелой (H) цепей (рис. 1–3). Каждый из доменов имеет характерную для иммуноглобулинов укладку цепи, представленную двумя скрученными β -слоями с антипараллельной структурой. Существенный вклад в стабилизацию структуры вносят пять ковалентных S–S-связей между остатками Cys, из них четыре внутрицепочечные 23–88 (V_L), 134–194 (C_L), 22–92 (V_H), 142–208 (C_H) и одна межцепочечная 214 (C_L) – 230 (C_H). Характерная особенность структуры — наличие шести *цис*-пептидных связей, предшествующих

остаткам пролина 8, 95, 141 в цепи L и 149, 151, 202 в цепи H.

Топология укладки полипептидных цепей в структуре комплекса Fab-LNKВ-2 с антигенным пептидом IL-2 человека в кристаллической пространственной группе $P2_12_12_1$ в целом близка к таковой в структуре ранее опубликованного комплекса в группе $P2_1$ [10]. Среднеквадратичное отклонение (RMSD) C^α -атомов всей структуры, отдельно антигенного пептида, легкой и тяжелой цепей обеих структур составило 0.745, 0.277, 0.574 и 0.871 Å соответственно. Более высокое разрешение структуры в группе $P2_12_12_1$ позволило уточнить геометрию отдельных областей комплекса. Наибольшее отличие по всем атомам продемонстрировал 9-членный антигенный пептид IL-2 (RMSD 1.713 Å).

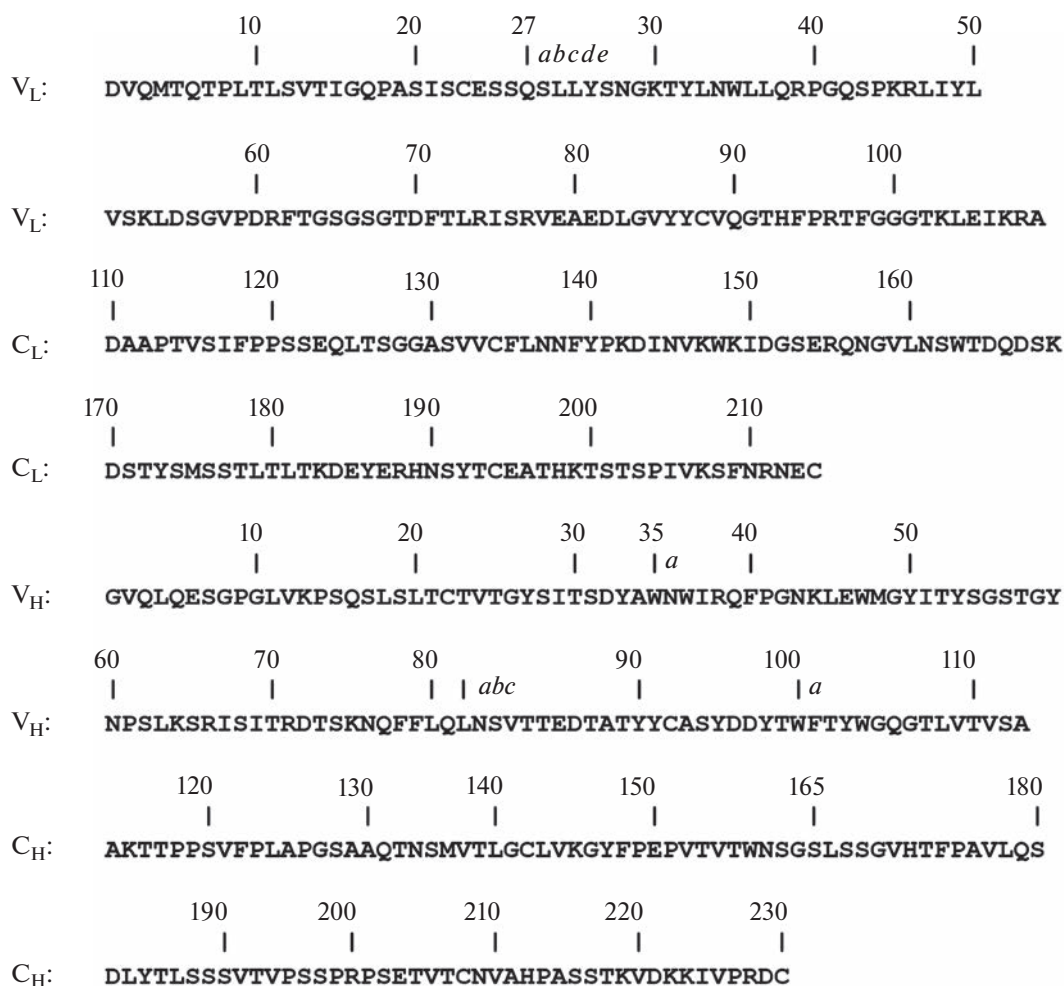


Рис. 1. Аминокислотная последовательность легкой цепи (L) и фрагмента тяжелой цепи (H) Fab-фрагмента антитела LNKВ-2 с обозначением вариабельных (V) и константных доменов (C). Нумерация остатков дана по номенклатуре Kabat et al. [11]; строчными курсивными буквами помечены остатки, сохраняющие номер предшествующего остатка.

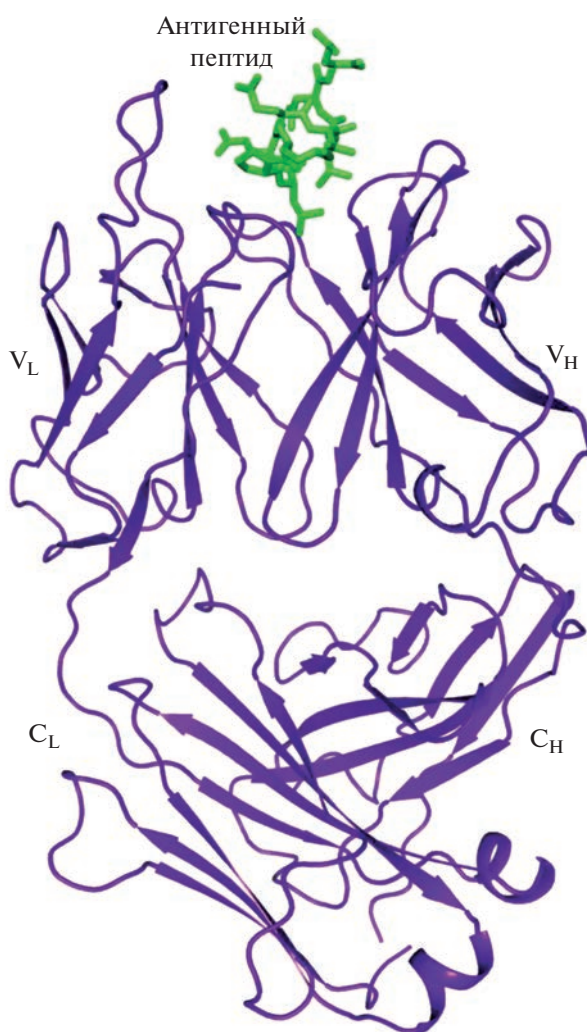


Рис. 2. Топология пространственной укладки комплекса Fab-фрагмента антитела LNKB-2 к IL-2 человека (показан фиолетовым цветом) с антигенным пептидом IL-2 (зеленый цвет).

Антигенсвязывающий центр. В формировании антигенсвязывающего центра Fab-LNKB-2 участвуют шесть гипервариабельных областей легкой и тяжелой цепей, по три от каждого V_L - и V_H -доменов, расположенных на петлевых участках с нерегулярной структурой. Нонапептидный фрагмент Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-O (64–72) эпитопа IL-2 принимает неидеальную форму α -спирали и связывается четырьмя гипервариабельными петлями, одна из которых принадлежит легкой (V_L) и три – тяжелой (V_H) цепям. Связывание пептида осуществляется за счет образования одного солевого мостика, четырех Н-связей и ряда гидрофобных ван-дер-ваальсовых контактов (табл. 1).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение Fab-фрагментов. Fab-фрагменты моноклонального антитела LNKB-2 к IL-2 человека получали по методике, описанной в работе Фокина с соавт. [8]. Для наработки препаративных количеств антител гибридные клетки LNKB-2 вводили мышам линии BALB/c. Выделенную асцитную жидкость подвергали очистке, раствор антител мышей диализовали против буфера, содержащего 25 мМ Tris-HCl (pH 7.3), 250 мМ NaCl, 1 мМ EDTA и 25 мМ меркаптоэтанол. Fab-LNKB-2 получали гидролизом моноклональных антител папаином. После очистки на колонке с DEAE-целлюлозой проводили препаративное разделение Fab-фрагментов на отдельные изоформы ме-

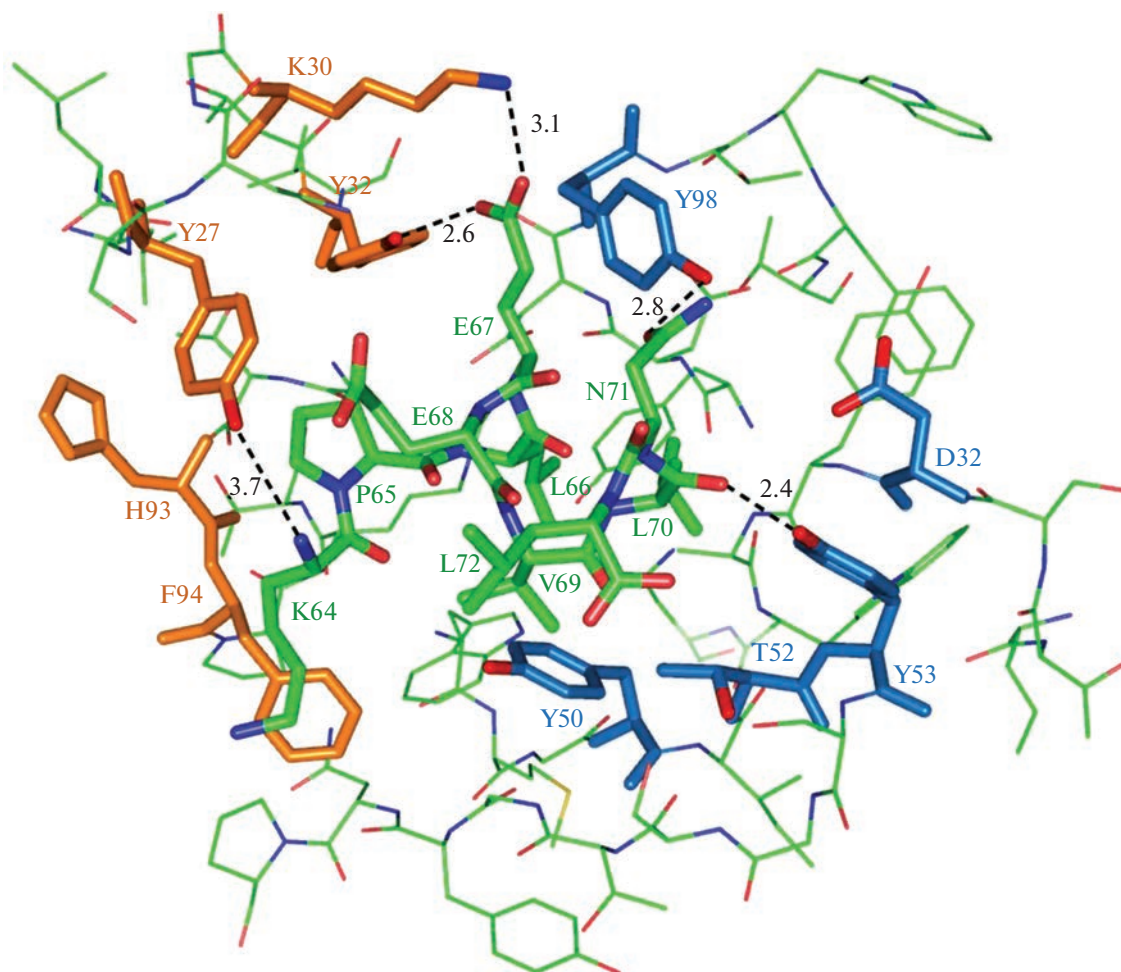


Рис. 3. Структура антигенсвязывающего центра Fab-фрагмента антитела LNKВ-2 к IL-2 человека (легкая и тяжелая цепи показаны, соответственно, оранжевым и синим цветами) в комплексе с антигенным пептидом IL-2 (зеленый цвет). Расстояния приведены в ангстремах.

Таблица 1. Стабилизирующие контакты Fab-фрагмента антитела LNKВ-2 в комплексе с антигенным пептидом IL-2: водородные связи и солевые мостики*

Антигенный пептид	Fab-фрагмент	Расстояние, Å
Lys64	Tyr27d (V _L)	3.65
Glu67	Tyr32 (V _L)	2.59
*Glu67	*Lys30 (V _L)	3.05
Asn71	Tyr98 (V _H)	2.85
Leu70 (C=O)	Tyr53 (V _H)	2.43

Таблица 2. Экспериментальные кристаллографические данные и статистика уточнения структуры комплекса Fab-LNKB-2

Кристаллографические параметры	
Пространственная группа	$P2_12_1$
Параметры ячейки (Å, град)	$a = 71.94, b = 72.22,$ $c = 88.33$
$Z(Z')$	4(1)
Область разрешения, Å	20.00–2.60
Число рефлексов	11 823
Полнота набора, %	69.4
R_{work}	0.158
R_{free}	0.240
Свободные рефлексы, %	7.7
Неводородные атомы модели	
Белковый комплекс	3454
Вода	53
RMSD от идеальных значений	
Длина связей, Å	0.005
Валентные углы, град	0.771
Торсионные углы (период 3), град	16.3
Хиральность, Å ³	0.037
Атомные плоскости, Å	0.004
Конформационная статистика Рамачандрана, %	
Предпочтит./разрешен./отклонения	93.9/4.3/1.8

тодом изоэлектрофокусирования. Фракция Fab-фрагментов с $pI \sim 8.1$ была использована для кристаллизации.

Кристаллизация и получение рентгеновских экспериментальных данных. Кристаллы комплекса Fab-LNKB-2 и синтетического пептида IL-2 (Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-O [12]) выращивали в варианте висячей капли при концентрации белка ~ 15 мг/мл из 10%-ного полиэтиленгликоля 4000, 7%-ного 2-пропанола, 60 мМ Na-HEPES (pH ~ 7.6). Рентгеновские экспериментальные данные получали на дифрактометре SC XRD (Bruker, Германия) с разрешением 2.6 Å. Кристаллографические данные и статистика уточнения приведены в табл. 2.

Определение структуры. Пространственная структура Fab-LNKB-2 была установлена мето-

дом молекулярного замещения с помощью программы Molrep [13] с использованием в качестве модели установленную ранее структуру комплекса Fab-LNKB-2 в альтернативной пространственной группе $P2_1$ [10]. Последующее кристаллографическое уточнение структуры проводили с помощью программы Refmac [14] попеременно с ручной правкой модели в электронной плотности с использованием программы Coot [15]. Координаты атомов структуры депонированы в международном банке белковых структур PDB с кодом доступа 7YZJ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлена пространственная структура Fab-фрагмента моноклонального антитела LNKB-2 к IL-2 человека в комплексе с антигенным нонапептидом IL-2 рентгеноструктурным методом в новой кристаллической пространственной группе $P2_12_1$ при разрешении 2.6 Å. Новая структура, по сравнению с ранее установленной в группе $P2_1$ при разрешении 3.0 Å, характеризуется повышенной точностью локализации атомов. Антигенный пептид в спиральной форме располагается в полости, образованной гипервариабельными участками тяжелой и легкой цепей Fab-фрагмента и специфически связывается четырьмя Н-связями, одним солевым мостиком и рядом гидрофобных взаимодействий.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено по теме 0101-2019-0016 госзадания ФГБУН “Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН.

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. Sela-Culang I., Kunik V., Ofra Y. // Front. Immunol. 2013. V. 4. P. 302.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00302>
2. Burkovitz A., Leiderman O., Sela-Culang I., Byk G., Ofra Y. // J. Immunol. 2013. V. 190. P. 2327–2334.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200757>

3. *Kapingidza A.B., Kowal K., Chruszcz M.* // *Subcell. Biochem.* 2020. V. 94. P. 465–497.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_19
4. *King M.T., Brooks C.L.* // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1785. P. 13–27.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7841-0_2
5. *Smith K.A.* // *Science.* 1988. V. 240. P. 1169–1176.
<https://doi.org/10.1126/science.3131876>
6. *Smith K.A.* // *Curr. Opin. Immunol.* 1992. V. 4. P. 271–276.
[https://doi.org/10.1016/0952-7915\(92\)90076-q](https://doi.org/10.1016/0952-7915(92)90076-q)
7. *Lunev V.E., Lukin Yu.V., Kazannykh N.V., Belyaev S.V., Zubov V.P., Nesmeyanov V.A.* // *Biomed. Sci.* 1990. V. 1. P. 68–72.
8. *Фокин А.В., Афонин П.В., Михайлова И.Ю., Цыганник И.Н., Мареева Т.Ю., Несмеянов В.А., Пэнгборн В., Ли Н., Дюэкс В., Сижак Е., Плетнев В.З.* // *Биоорг. химия.* 2000. Т. 26. С. 571–578. [*Fokin A.V., Afonin P.V., Mikhailova I.Yu., Tsygannik I.N., Mareeva T.Yu., Nesmeyanov V.A., Pangborn W., Lee N., Duax W., Ciszak E., Pletnev V.Z.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2000. V. 39. P. 512–519.]
<https://doi.org/10.1007/BF02758622>
9. *Плетнев В.З., Горячева Е.А., Цыганник И.Н., Несмеянов В.А., Плетнев С.В., Пэнгборн В., Дюэкс В.* // *Биоорг. химия.* 2004. Т. 30. С. 466–469. [*Pletnev V.Z., Goryacheva E.A., Tsygannik I.N., Nesmeyanov V.A., Pletnev S.V., Pangborn W., Daux W.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2004. V. 30. P. 417–420.]
<https://doi.org/10.1023/b:rubi.0000043783.73562.ef>
10. *Afonin P.V., Fokin A.V., Tsygannik I.N., Mikhailova I.Yu., Onoprienko L.V., Mikhaleva I.I., Ivanov V.T., Mareeva T.Yu., Nesmeyanov V.A., Li N., Pangborn W.A., Duax W.L., Pletnev V.Z.* // *Protein Sci.* 2001. V. 10. P. 1514–1521.
<https://doi.org/10.1110/ps.3101>
11. *Kabat E.A., Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S., Foeller C.* // *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, 1991.
12. *Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Иванов В.Т., Войтенков Б.О., Окулов В.Б.* // *Биоорг. химия.* 1996. Т. 22. С. 180–190. [*Onoprienko L.V., Mikhaleva I.I., Ivanov V.T., Voitenkov B.O., Okulov V.B.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 1996. V. 22. P. 156–165.]
13. *Vagin A., Teplyakov A.* // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. P. 22–25.
<https://doi.org/10.1107/S0907444909042589>
14. *Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A., Pannu N.S., Steiner R.A., Nicholls R.A., Winn M.D., Long F., Vagin A.A.* // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2011. V. 67. P. 355–367.
<https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>
15. *Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K.* // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. P. 486–501.
<https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>

Three-Dimensional Structure of Fab Fragment of Monoclonal Antibody LNKБ-2 Complexed with Antigenic Nonapeptide from Human Interleukin-2

E. A. Goryacheva*,[#], I. V. Artemyev*, N. V. Pletneva*, and V. Z. Pletnev*

[#]Phone: +7 (495) 330-75-10; e-mail: goryacheva@ibch.ru

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

The three-dimensional structure of the antigen-binding fragment (Fab) of the monoclonal antibody LNKБ-2 in complex with the synthetic antigenic nonapeptide of human interleukin-2 (IL-2; Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-O) was determined by X-ray method at a resolution of 2.6 Å in crystal space group P2₁2₁2₁. The peptide adopts a somewhat distorted α-helical conformation, close to that of fragment 64–72 of the IL-2 antigen. Four out of the six hypervariable loops in the antigen-binding site of the Fab fragment are involved in nonapeptide association through hydrogen bonding, salt bridge formation, and hydrophobic interactions. Moreover, Tyr residues of an antibody play an important role in antigen-antibody recognition.

Keywords: monoclonal antibody, Fab fragment, interleukin-2 antigen, three-dimensional structure, X-ray study



УДК 577.112.343

УДОБНЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ *трет*-БУТИЛОВЫХ ЭФИРОВ N_α -ЗАЩИЩЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ ИЗ *трет*-БУТАНОЛА¹

© 2023 г. В. Н. Азев*, #, А. Н. Чулин*, М. В. Молчанов**, А. И. Мирошников***

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

**ФГБУН “Институт теоретической и экспериментальной биофизики” РАН, Россия, 142290 Пущино, ул. Институтская, 3

***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 01.12.2022 г.

После доработки 20.12.2022 г.

Принята к публикации 21.12.2022 г.

Разработан новый метод получения третичных бутиловых эфиров N_α -защищенных аминокислот из *трет*-бутанола с использованием безводного сульфата магния и избытка эфирата трехфтористого бора в качестве конденсирующего агента. Метод позволяет получать третичные бутиловые эфиры с высоким выходом. Изучена устойчивость различных функциональных групп боковых цепей аминокислот к условиям реакции.

Ключевые слова: эфират трехфтористого бора, *трет*-бутиловые эфиры аминокислот, защитная группа, кислота Льюиса

DOI: 10.31857/S0132342323030053, **EDN:** PDKPOP

ВВЕДЕНИЕ

Третичные бутиловые эфиры аминокислот находят широкое применение в химическом синтезе пептидов в качестве защитной группы, при этом для их получения до сих пор используются классические методы [1–3], несмотря на развитие альтернативных способов [4].

В одном из классических методов третичные бутиловые эфиры синтезируют, обрабатывая изобутиленом соответствующую аминокислоту или ее производное при катализе минеральными кислотами [5, 6]. Широкому использованию данного метода способствуют доступность исходных веществ и высокие выходы целевых продуктов [7, 8]. В то же время этот процесс считается довольно опасным в осуществлении, поскольку синтез приходится проводить под давлением в герметичном сосуде для предотвращения утечки избытка воспламеняющегося изобутилена.

Однако этот метод был модернизирован, и в новых условиях он стал более безопасным [9].

В описанной методике использовали *трет*-бутанол (5 экв.) в присутствии гетерогенного катализатора, который получали адсорбцией серной кислоты на безводном сульфате магния. В реакцию вступали различные карбоновые кислоты, включая две защищенные аминокислоты, при этом авторы не наблюдали существенного увеличения давления в реакционном аппарате, несмотря на их предположение, что изобутилен оказывается промежуточным продуктом.

Поскольку в указанных условиях не нужно применять жидкий изобутилен, эта методика получения третичных бутиловых эфиров приобрела значительную популярность в лабораторной практике, о чем можно косвенно судить по количеству литературных ссылок на нее. Однако при воспроизведении условий этой методики нам не удалось получить соответствующий эфир, используя N_α -пальмитоилированное производное глутаминовой кислоты в качестве исходного соединения. Более того, мы не смогли воспроизвести заявленный выход для довольно простого субстрата Cbz-Ala-OH. Литературный поиск показал, что для других исходных веществ метод оказался также непригодным [10, 11], а в одном из успешных случаев его практической реализации были изменены условия проведения — увеличено время реакции до нескольких суток [12].

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: APCI — химическая ионизация при атмосферном давлении; Fm — 9-флуоренилметил; Нер — гептан; In — индол; Palm — пальмитоил.

Автор для связи: (тел.: +7 (496) 773-54-42; эл. почта: viatcheslav.azev@bibch.ru).

Целью данной работы был поиск альтернативных условий взаимодействия *трет*-бутанола с производными аминокислот, поскольку перечисленные выше экспериментальные факты и литературные сведения свидетельствовали о том, что методика Wright et al. [9] неоптимальна для широкого круга субстратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальную работу проводили, изначально используя в качестве субстрата производное глутамина, т.к. соответствующий продукт реакции (Cbz-Gln-OBu', (I)) – кристаллическое вещество, следовательно, его выход в модифицированных условиях может быть довольно точно установлен.

Варьируя природу дегидратирующего агента, растворителя и кислоты Льюиса, мы обнаружили, что наибольший выход соединения (I) (~60%) может быть достигнут при использовании 3.0–3.5 мольных эквивалентов BF₃ · Et₂O в присутствии сульфатов натрия, магния или кальция в дихлорметане. В выявленных условиях проводили исследование круга субстратов, вступающих в реакцию *трет*-бутирования, при этом особое внимание уделяли возможности протекания побочных реакций алкилирования функциональных групп боковых цепей аминокислот и стабильности защитных групп. Так, было обнаружено, что N_α-Вос-защищенные аминокислоты не подходят в качестве субстратов, поскольку эта защитная группа оказалась нестабильной в условиях реакции. В то же время субстраты с Cbz- или Fmoc-N_α-защитными группами превращались в соответствующие третичные бутиловые эфиры с высокими выходами.

В отношении возможности протекания побочных реакций алкилирования следует отметить, что при проведении экспериментов не было обнаружено свидетельств модификации ароматического кольца флуорена, амидной боковой цепи и атома серы при использовании производных Fmoc-Ala-OH, Cbz-Gln-OH (в противоположность, алкилирование наблюдали в одном из ва-

риантов классических условий [13]) и Cbz-Cys(Bzl)-OH. Защищенное в боковой цепи производное триптофана Cbz-Trp(For)-OBu' также было получено с высоким выходом без признаков образования каких-либо побочных продуктов модификации индольного цикла. В то же время использование производного тирозина, не имеющего защитной группы ароматического кольца, в условиях реакции привело к получению смеси (предположительно) продуктов модификации боковой цепи. Незащищенная же гидроксигруппа в производном Cbz-Ser-OMe вступила в реакцию алкилирования, в результате с высоким выходом был выделен соответствующий простой *трет*-бутиловый эфир. Возможность получения других простых *трет*-бутиловых эфиров в настоящее время изучается. Следует отметить, что γ-защищенное производное глутаминовой кислоты, Palm-Glu(OMe)-OH, оказалось не самым лучшим субстратом в исследуемых условиях, возможно из-за стерических препятствий или гидрофобного окружения реакционного центра, создаваемых остатком пальмитиновой кислоты. Тем не менее именно при масштабировании изученного нами метода удалось синтезировать достаточное количество пальмитоилированного производного (IV), необходимого нам для получения биологически активных пептидов с модифицированными фармакокинетическими свойствами. В табл. 1 представлены субстраты и продукты реакции синтеза третичных бутиловых эфиров аминокислот с использованием разработанного метода.

Известно, что BF₃ · Et₂O (без использования дегидратирующего агента) применялся для получения третичного амидового эфира 4-аминобензойной кислоты из соответствующего спирта в довольно жестких условиях [14]. Следовые количества третичного бутилового эфира бензойной кислоты были выделены из ее реакции с *трет*-бутанолом, промотируемой самим BF₃ также при использовании жестких условий (кипение при температуре кипения спирта) [15]. Мы не обнаружили в литературе иных сведений об использовании BF₃ или его производных для получения тре-

Таблица 1. Взаимодействие производных аминокислот с *трет*-бутанолом в присутствии системы BF₃ · Et₂O–MgSO₄

Субстрат	Продукт	Выход, %
Cbz-Gln-OH	Cbz-Gln-OBu' (I)	58
Fmoc-Ala-OH	Fmoc-Ala-OBu' (II)	51
Cbz-Cys(Bzl)-OH	Cbz-Cys(Bzl)-OBu' (III)	50
Palm-Glu(OMe)-OH	Palm-Glu-OBu' (IV)	25 (на две стадии)
Cbz-Trp(For)-OH	Cbz-Trp(For)-OBu' (V)	42
Cbz-Ser-OMe	Cbz-Ser(Bu')-OMe (VI)	56

тичных эфиров из соответствующих третичных спиртов и карбоновых кислот. В то же время нам не удалось получить соединение (I), используя условия Kadaba et al. [14], возможно, потому что образующийся изобутилен испаряется из реакционной смеси (т. кип. -7°C). И хотя эти условия несколько отличаются от обнаруженных нами, при получении третичных бутиловых эфиров из трет-бутанола, по-видимому, важно проводить реакцию при более низкой температуре. Возможные причины того, почему сульфат магния позволяет проводить этерификацию в более мягких условиях, служат предметом отдельного изучения.

Необходимо также отметить, что у нас нет доводов в пользу того, что механизм этерификации аминокислот трет-бутанолом в присутствии системы $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}-\text{MgSO}_4$ отличается от предложенного ранее для реагента $\text{H}_2\text{SO}_4-\text{MgSO}_4$ [9], в котором изобутилен постулирован в качестве интермедиата. В литературе описаны реакции образования алкенов при дегидратации третичных спиртов [16] и присоединения алкенов к карбоновым кислотам с образованием эфиров [17], при этом обе реакции протекают в мягких условиях при использовании производных BF_3 .

Таким образом, мы предлагаем альтернативный безопасный метод получения третичных бутиловых эфиров из трет-бутанола. Тщательное изучение круга субстратов, вступающих в реакцию введения третичной бутильной защитной группы, служит предметом последующих исследований, его результаты будут опубликованы позднее, однако предварительные данные свидетельствуют о том, что при использовании новой системы ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}-\text{MgSO}_4$) многие производные аминокислот будут селективно вступать в реакцию этерификации с трет-бутанолом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все растворители, гидрокарбонат натрия, карбонат калия, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, безводный сульфат магния, хлористоводородная кислота — коммерчески доступные продукты (Реахим и Химмед, Россия). При необходимости их подвергали очистке по описанным методикам [18]. Все стандартные производные аминокислот — продукция компаний Reanal (Венгрия) и IRIS Biotech GmbH (Германия). N_α -Пальмитоил- γ -метил-глутамат получали по известной методике [19]. Спектры ЯМР регистрировали на приборе Avance III (BioSpin, Bruker, Германия) (^1H при 600 МГц, ^{13}C при 125 МГц) и калибровали по сигналам остаточных протонов дейтерированного растворителя. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе Orbitrap Elite Hybrid Ion Trap-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Германия). ТСХ проводили на пластинах F₂₅₄ Silica Gel G Plates (Part

1.05554.0001; Merck, Германия). Детекцию соединений на пластинах осуществляли с использованием: 1) раствора нингидрина (0.5 г нингидрина, 250 мл бутанола-1, 50 мл уксусной кислоты, 10 мл сим-коллидина) с последующим нагревом; 2) паров иода; 3) УФ-облучения; 4) насыщенного раствора фосфорномолибденовой кислоты в этаноле (~12 мас. %) с последующим нагревом.

Общая методика введения трет-бутильной защитной группы. N_α -защищенную аминокислоту (5 ммоль) растворяли или суспендировали в дихлорметане (20 мл) в толстостенном сосуде (100 мл), снабженном закручивающейся крышкой и якорем магнитной мешалки. При необходимости смесь слегка подогревали для растворения исходного вещества. К полученному раствору добавляли третичный бутиловый спирт (5 мл, 52.5 ммоль) и MgSO_4 (4.0–4.3 г). Реакционную смесь охлаждали до температуры от -8 до -10°C и вносили $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2 мл, 16.2 ммоль) одной порцией. Сосуд герметично закрывали, перемешивали при температуре от -8 до -10°C в течение 10 мин, а затем 18 ч при комнатной температуре за защитным экраном. Реакционную смесь охлаждали до температуры от -8 до -10°C и медленно выливали на NaHCO_3 (5–7 г). Полученную суспензию перемешивали 10 мин, фильтровали, осадок на фильтре промывали дихлорметаном (3×10 мл). Объединенные органические фазы промывали 5%-ным водным K_2CO_3 (2×30 мл), 0.1 М водным HCl (30 мл), водой (2×30 мл) и сушили над безводным MgSO_4 в течение 2 ч. Осушенный раствор фильтровали, осадок на фильтре промывали дихлорметаном (3×10 мл). Объединенные фазы упаривали в вакууме, остаток очищали перекристаллизацией (EtOAc/n -гептан) или хроматографией на силикагеле.

Трет-бутиловый эфир N_α -бензилоксикарбонил-L-глутамин (I) (выход 0.98 г, 58%). $R_f = 0.5$ (9 : 1 v/v $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$), $R_f = 0.25$ (4 : 1 v/v EtOAc/Hep); т. пл. $93-96^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{25} = -19.5^\circ$ ($c = 0.9$, этанол), (лит: т. пл. $91-93^\circ\text{C}$), $[\alpha]_D^{25} = -19.7^\circ$ ($c = 0.9$, этанол) [13]. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3 ; J , Гц): 1.46 (с, 9H, Bu^t), 1.87–1.96 (м, 1H, $\text{H}\beta$), 2.14–2.37 (м, 3H, $\text{H}\beta$, 2H γ), 4.26 (ддд, J 4.64, 8.17, 9.47, 1H, $\text{H}\alpha$), 5.09 (д, J 12.5, 1H, PhCH_2), 5.12 (д, J 12.5, 1H, PhCH_2), 5.26 (уш. с., 1H, NH), 5.55 (д, J 8.06, 1H, $\text{NH}\alpha$), 5.99 (уш. с., 1H, NH), 7.29–7.39 (м, 5H, PhCH_2). Спектр ^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 177.51, 172.92, 158.70, 136.91, 128.35, 127.71, 127.63, 82.84, 67.64, 55.92, 32.64, 28.45, 28.23.

Трет-бутиловый эфир N_α -флуоренилметилоксикарбонил-L-аланина (II) (выход 0.94 г, 51%). $R_f = 0.73$ (1 : 1 v/v EtOAc/Hep), $R_f = 0.42$ (1 : 2 v/v EtOAc/Hep). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$; J , Гц): 1.25 (м, 3H, $\text{H}\beta$), 1.38 (с, 9H, Bu^t), 3.94 (п, J 7.4, 1H, $\text{H}\alpha$),

4.12–4.36 (м, 3H, CHCH₂), 7.30–7.36 (м, 2H, HAr), 7.42 (шт, *J* 7.2, 2H, HAr), 7.57–7.79 (м, 3H, NH, HAr), 7.89 (д, *J* 7.4, 2H, HAr). Спектр ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 172.07, 155.77, 143.82, 143.77, 140.70, 127.59, 127.02, 125.19, 125.17, 120.07, 80.26, 65.51, 49.88, 46.63, 27.59, 16.92. HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 368.1852; вычислено для C₂₂H₂₆NO₄⁺, [*M* + H]⁺ 368.1856.

Трет-бутиловый эфир *N*_α-бензилоксикарбонил-*S*-бензил-L-цистеина (III) (выход 1.01 г, 50%). *R*_f = 0.81 (1 : 1 v/v EtOAc/Нер), *R*_f = 0.47 (1 : 2 v/v EtOAc/Нер). Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃; *J*, Гц): 1.45 (с, 9H, Bu'), 2.71–2.92 (м, 2H, Hβ), 3.66–3.76 (м, 2H, SCH₂Ph), 4.26–4.54 (м, 1H, Hα), 5.11 (д, *J* 12.59, 1H, OCH₂Ph), 5.13 (д, *J* 12.59, 1H, OCH₂Ph), 5.22–5.66 (м, 1H, NH), 7.21–7.25 (м, 1H, Ar), 7.26–7.42 (м, 9H, Ar). Спектр ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 169.85, 155.88, 137.94, 136.45, 129.10, 128.70, 128.67, 128.32, 128.25, 127.32, 82.87, 67.12, 54.18, 36.90, 34.02, 28.10. HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M*, 424.1548; вычислено для C₂₂H₂₇NNaO₄S⁺ [*M* + Na]⁺ 424.1553.

α-Трет-бутил-*N*_α-пальмитоил-L-глутаминовая кислота (IV). Соединение Palm-Glu(OMe)-ОН этерифицировали трет-бутанолом по общей методике. Полученный неочищенный γ-метилловый α-трет-бутиловый эфир подвергали гидролизу по общей методике [2], смесь продуктов гидролиза очищали методом флэш-хроматографии и получали целевой продукт (IV) (выход 0.55 г, 25% на две стадии). Т. пл. 68–70°C; *R*_f = 0.5 (9 : 1 v/v CHCl₃/MeOH), *R*_f = 0.35 (8 : 1 v/v PhMe/AcOH). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆; *J*, Гц): 0.85 (шт, *J* 6.81, 3H), 1.16–1.30 (м, 24H), 1.38 (с, 9H, Bu'), 1.44–1.53 (м, 2H), 1.67–1.78 (м, 1H, Hβ), 1.86–1.94 (м, 1H, Hβ), 2.08 (шт, *J* 7.41, 2H), 2.20–2.32 (м, 2H, Hγ), 4.08–4.16 (м, 1H, Hα), 8.03 (д, *J* 7.81, 1H, NH), 12.15 (уш. с, 1H). Спектр ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 173.54, 172.28, 171.05, 80.32, 51.80, 34.95, 31.21, 29.95, 28.94, 28.91, 28.86, 28.69, 28.62, 28.60, 28.46, 27.56, 26.22, 25.17, 21.99, 13.84. HRMS (APCI) *m/z*: найдено *M*, 464.3338; вычислено для C₂₅H₄₇NNaO₅⁺ [*M* + Na]⁺ 464.3346.

Трет-бутиловый эфир *N*_α-бензилоксикарбонил-*N*^{ln}-формил-L-триптофана (V) (выход 0.86 г, 42%). *R*_f = 0.54 (1 : 1 v/v EtOAc/Нер), *R*_f = 0.4 (1 : 2 v/v EtOAc/Нер). Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃; *J*, Гц) (*E*- и *Z*-ротамеры наблюдаются при 298 К, как это известно для ацилированных гетероциклических соединений [20]): 1.36 (с, 9H, Bu'), 3.02–3.20 (м, 1H, Hβ), 3.26 (дд, *J* 5.72, 14.88, 1H, Hβ), 4.45–4.70 (м, 1H, Hα), 5.08 (уш. д, *J* 11.92, 1H, PhCH₂), 5.14 (д, *J* 12.19, 1H, PhCH₂), 5.41 (д, *J* 7.52, 1H, NH), 7.13 (уш. с, 0.65 H, In2H (*Z*)); 7.27–7.80 (м, 8.7H, Ar), 8.38 (д, *J* 7.5, 0.65H, In-H (*Z*)), 8.99 (уш. с, 0.65H, для (*Z*)), 9.38 (уш. с, 0.35H, для (*E*)). Спектр ¹³C-

ЯМР (CDCl₃) (для доминирующего изомера (*Z*)): 170.38, 158.97, 155.57, 136.14, 134.06, 131.27, 128.39, 128.06, 128.00, 125.31, 124.39, 119.05, 118.47, 115.97, 109.43, 82.50, 66.77, 54.07, 27.92, 27.75. HRMS (APCI) *m/z*: найдено *M*, 445.1740; вычислено для C₂₄H₂₆N₂NaO₅⁺ [*M* + Na]⁺ 445.1734.

Метилловый эфир *N*_α-бензилоксикарбонил-*O*-трет-бутил-L-серина (VI) (выход 0.87 г, 56%). *R*_f = 0.7 (1 : 1 v/v EtOAc/Нер), *R*_f = 0.38 (1 : 2 v/v EtOAc/Нер). Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃; *J*, Гц): 1.12 (с, 9H, Bu'), 3.58 (дд, *J* 3.29, 9.05, 1H, Hβ), 3.63–3.86 (м, 4H, Hβ, OCH₃), 4.27–4.51 (м, 1H, Hα), 5.11 (д, *J* 12.17, 1H, PhCH₂), 5.14 (д, *J* 12.18, 1H, PhCH₂), 5.26–5.79 (м, 1H, NH), 7.27–7.43 (м, 5H, PhCH₂). Спектр ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 171.27, 156.28, 136.49, 128.67, 128.28, 73.57, 67.14, 62.15, 54.82, 52.48, 27.40. HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M*, 332.1471; вычислено для C₁₆H₂₃NNaO₅⁺ [*M* + Na]⁺ 332.1468.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан новый эффективный и безопасный метод получения третичных бутиловых эфиров *N*_α-защищенных аминокислот из трет-бутанола с использованием безводного сульфата магния и избытка эфира трихлористого бора в качестве конденсирующего агента. В реакцию вступают производные аминокислот, содержащие различные заместители при атоме азота и в боковой цепи. Метод пригоден для получения нестандартных защищенных производных, которые находят применение в химическом синтезе пептидов и модификации белков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.ф.-м.н. А.К. Сурину (Институт белка РАН) за помощь в регистрации масс-спектров высокого разрешения.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 2019 0101-2019-0014).

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. *Isidro-Llobet A., Álvarez M., Albericio F.* // Chem. Rev. 2009. V. 109. P. 2455–2504.
<https://doi.org/10.1021/cr800323s>
2. *Kohlbaun H.-J., Thürmer R., Voelter W.* // Synthesis of Peptides and Peptidomimetics (Houben-Weyl E22a: Methods of Organic Chemistry) / Eds. Goodman M., Felix A.M., Moroder L., Toniolo C. Stuttgart and New York: Georg Thieme Verlag, 2002. P. 193–237.
3. *Thürmer R., Kohlbaun H.-J., Voelter W.* // Synthesis of Peptides and Peptidomimetics (Houben-Weyl E22a: Methods of Organic Chemistry) / Eds. Goodman M., Felix A.M., Moroder L., Toniolo C. Stuttgart and New York: Georg Thieme Verlag, 2002. P. 238–259.
4. *Wuts P.G.M.* // Greene's Protective Groups in Organic Synthesis. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2014. P. 686–836.
5. *Taschner E., Liberek B., Wasielewski Cz., Biernat J.* // Angew. Chem. 1959. V. 71. P. 743–743.
<https://doi.org/10.1002/ange.19590712307>
6. *Roeske R.W.* // Chem. & Ind. 1959. V. 23. P. 1121–1122.
7. *Roeske R.* // J. Org. Chem. 1963. V. 28. P. 1251–1253.
<https://doi.org/10.1021/jo01040a022>
8. *Anderson G.W., Callahan F.M.* // J. Am. Chem. Soc. 1960. V. 82. P. 3359–3363.
<https://doi.org/10.1021/ja01498a032>
9. *Wright S.W., Hageman D.L., Wright A.S., McClure L.D.* // Tetrahedron Lett. 1997. V. 38. P. 7345–7348.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)01792-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)01792-9)
10. *Berridge M.S., Burnazi E.M.* // J. Labelled Cpd. Radiopharm. 2001. V. 44. P. 859–864.
<https://doi.org/10.1002/jlcr.510>
11. *McDermott T.S., Bhagavatula L., Borchardt T.B., Engstrom K.M., Gandarilla J., Kotecki B.J., Kruger A.W., Rozema M.J., Sheikh A.Y., Wagaw S.H., Wittenberger S.J.* // Org. Proc. Res. Dev. 2009. V. 13. P. 1145–1155.
<https://doi.org/10.1021/op900197r>
12. *Chaleix V., Sol V., Huang Y.-M., Guilloton M., Granet R., Blais J.C., Krausz P.* // Eur. J. Org. Chem. 2003. V. 2003. P. 1486–1493.
<https://doi.org/10.1002/ejoc.200390208>
13. *Schnabel E., Schüssler H.* // Liebigs Ann. Chem. 1965. V. 686. P. 229–238.
<https://doi.org/10.1002/jlac.19656860127>
14. *Kadaba P.K., Carr M., Tribo M., Triplett J., Glasser A.C.* // J. Pharm. Sci. 1969. V. 58. P. 1422–1423.
<https://doi.org/10.1002/jps.2600581131>
15. *Sowa F.J., Nieuwland J.A.* // J. Am. Chem. Soc. 1936. V. 58. P. 271–272.
<https://doi.org/10.1021/ja01293a022>
16. *Posner G.H., Shulman-Roskes E.M., Oh Ch. Ho, Carry J.-Ch., Green J.V., Clark A.B., Dai H., Anjeh T.E.N.* // Tetrahedron Lett. 1991. V. 32. P. 6489–6492.
[https://doi.org/10.1016/0040-4039\(91\)80200-P](https://doi.org/10.1016/0040-4039(91)80200-P)
17. *Topchiev A.V., Zavgorodnii S.V., Paushkin Ya.M.* // Boron Fluoride and Its Compounds as Catalysts in Organic Chemistry / Eds. Doering W., Barton D.H.R. Pergamon, 1958. P. 205–226.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-009128-0.50011-2>
18. *Armarego W.L.F., Chai C.* // Purification of Laboratory Chemicals, 6th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2012.
19. *Hueber A., Gimbert Y., Langevin G., Galano J.-M., Guy A., Durand T., Cenac N., Bertrand-Michel J., Tabet J.-C.* // Amino Acids. 2022. V. 54. P. 241–250.
<https://doi.org/10.1007/s00726-021-03109-1>
20. *Benassi R., Folli U., Schenetti L., Taddei F.* // Adv. Het. Chem. 1987. V. 41. P. 75–186.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2725\(08\)60161-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2725(08)60161-0)

Convenient Preparation of *tert*-Butyl Amino Acid Esters from *tert*-Butanol

V. N. Azev*, #, A. N. Chulin*, M. V. Molchanov**, and A. I. Miroshnikov***

#Phone: +7 (496) 773-54-42; e-mail: viatcheslav.azev@bibch.ru

*Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Bioorganic Chemistry Institute RAS, prosp. Nauki 6, Puschino, 142290 Russia

**Institute for Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Institutskaya ul. 3, Puschino, 142290 Russia

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

A preparation of *tert*-butyl esters of amino acid is described that proceeds from protected amino acids and *tert*-butanol using anhydrous magnesium sulfate and an excess of boron trifluoride diethyl etherate as additional reagents. The method affords *tert*-butyl esters in good yields and a variety of amino acid side chains and substituents tolerate the reaction conditions.

Keywords: boron trifluoride diethyl etherate, *tert*-butyl esters of amino acids, protecting group, Lewis acid



НОВЫЙ ПЕПТИД ИЗ ЯДА МАДАГАСКАРСКОЙ КОШАЧЬЕГЛАЗОЙ ЗМЕИ *Madagascarophis colubrinus* БЛОКИРУЕТ НИКОТИНОВЫЙ ХОЛИНОРЕЦЕПТОР¹

© 2023 г. Е. В. Крюкова*, Д. А. Иванов**, Н. В. Копылова*, В. Г. Старков*, Т. В. Андреева*,
И. А. Иванов*, В. И. Цетлин*, Ю. Н. Уткин*.*

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

**ФКОО “Лабкорп”, Россия, 107045 Москва, ул. Трубная, 12

Поступила в редакцию 19.11.2022 г.

После доработки 21.12.2022 г.

Принята к публикации 22.12.2022 г.

При скрининге ядов различных видов змей мы обнаружили, что яд мадагаскарской кошачьеглазой змеи *Madagascarophis colubrinus* конкурирует с α -бунгаротоксином за связывание с никотиновым холинорецептором *Torpedo californica*. С использованием жидкостной хроматографии из яда выделен пептид, ингибирующий связывание α -бунгаротоксина с этим рецептором и названный маколуксином. Аминокислотная последовательность этого 23-членного пептида установлена методом автоматической деградации по Эдману. Сравнение с аминокислотными последовательностями известных белков показало, что последовательность маколуксина гомологична α -спиральному участку последовательности металлопротеиназ яда змей. Пептид маколуксин был синтезирован методом твердофазного пептидного синтеза. Исследование его биологической активности показало, что маколуксин ингибирует связывание α -бунгаротоксина с рецептором *Torpedo* ($IC_{50} = 47$ мкМ). Маколуксин также обратимо ингибировал токи, вызванные ацетилхолином в никотиновом холинорецепторе мышечного типа человека. Это первые данные о наличии в яде заднебороздчатых змей пептида, способного ингибировать никотиновый холинорецептор.

Ключевые слова: мадагаскарская кошачьеглазая змея, яд, никотиновый холинорецептор, пептид, ингибитор, маколуксин

DOI: 10.31857/S0132342323030156, EDN: PDSQUE

ВВЕДЕНИЕ

Одно из основных назначений яда у змей — его использование при охоте. Наиболее эффективный путь обездвигнуть жертву — это нарушить функцию нервной системы. Данная стратегия используется змеями семейства Elapidae, яд которых содержит нейротоксины, блокирующие нервно-мышечную передачу. Змеи этого семейства имеют хорошо развитый аппарат для впрыскивания яда, включающий передние зубы, поэтому их называют переднебороздчатыми змеями (в англоязычной классификации — proteroglyphous snakes). В русскоязычной классификации к переднебороздчатым относят также змей семейства

Viperidae (в англоязычной классификации — ophioglyphous snakes), яды которых обладают в основном гемотоксичностью. Укусы этих змей весьма опасны для человека. Следует отметить, что имеется многочисленная группа змей, объединенных в различные семейства, у которых зубы для впрыскивания яда расположены в заднем отделе челюсти, это так называемые заднебороздчатые змеи (в англоязычной классификации — opisthoglyphous snakes). Большинство из них не опасны для человека, а некоторые виды содержатся в качестве домашних питомцев. Так, довольно популярный и часто встречающийся у террариумистов вид — мадагаскарская кошачьеглазая змея *Madagascarophis colubrinus*.

M. colubrinus — вид змей семейства Lamprophiidae, подсемейства Pseudoxynophiidae, обитающего в основном на Мадагаскаре [1]. Эти змеи встречаются в самых разных средах обитания по всему острову Мадагаскар, от горных районов до тропических лесов. В основном ведут ночной на-

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: ALEXA488-Bgt — α -Bgt, флуоресцентно меченный красителем ALEXA 488; α -Bgt — α -бунгаротоксин; АХ — ацетилхолин; nXP — никотиновый холинорецептор.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-65-22; эл. почта: yutkin@yandex.ru; utkin@ibch.ru).

земный образ жизни, умеют лазать и хорошо плавают. Они питаются разнообразной добычей, включая хамелеонов и грызунов. Их яд слаб и часто недостаточно силен, чтобы умертвить выбранную добычу, поэтому они также используют компрессию по мере необходимости. Для человека укус этой змеи умеренно ядовитый [2]. Отравление может вызвать острые локальные эффекты, которые включают боль, отек, образование пузырей и некроз тканей [3].

Ранее ряд нейротоксинов был идентифицирован в ядах заднебороздчатых змей. Так, из ядов змей рода *Boiga* семейства Colubridae выделены нейротоксины, относящиеся к семейству трехпелтельных токсинов [4]. Нейротоксины этого же семейства идентифицированы в яде зеленой виноградной змеи *Oxybelis fulgidus* [5] и ложной коралловой змеи *Rhinobothryum bovallii* [6], оба этих вида также принадлежат семейству Colubridae. Следует отметить, что, хотя был проведен транскриптомный [7] и протеомный [8] анализ ядов заднебороздчатых змей семейства Lamprophiidae, данные об идентификации и выделении нейротоксинов из их ядов отсутствуют.

Что касается нейротоксинов змей семейства Viperidae, ранее мы показали, что фосфолипазы A2 из ядов этих змей обладают способностью ингибировать никотиновые холинорецепторы (нХР) [9, 10]. Еще несколько разных пептидно-белковых ингибиторов нХР были выделены нами из ядов змей этого семейства [11–13]. Приведенные данные свидетельствуют о перспективности ядов змей семейства Viperidae в качестве источника нейроактивных соединений.

Цель настоящей работы — изучение нейротоксической активности ядов ряда змей семейства Viperidae и мадагаскарской кошачьеглазой змеи *M. colubrinus*, а также выделение токсина, проявляющего нейротоксичность, из яда *M. colubrinus*. Поскольку наиболее ярко нейротоксичность проявляется при блокировании нервно-мышечной передачи, в качестве теста мы использовали ингибирование функции нХР, выступающего ключевым элементом нервно-мышечной передачи.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие ядов змей с никотиновым холинорецептором. В настоящей работе активность ядов и их компонентов определяли по конкуренции с α -бунгаротоксином (α -Bgt) за связывание с нХР. Этот токсин — высокоэффективный антагонист нейронных нХР типов $\alpha 7$ и $\alpha 9$, а также нХР мышечного типа и до сих пор широко используется в качестве маркера этих рецепторов [14]. Мишень α -Bgt в нашей работе — нХР мышечного типа. Ранее мы успешно применяли флуоресцентно меченый α -Bgt для исследования токсин-рецеп-

торных взаимодействий [13, 15]. В настоящей работе мы использовали производное α -Bgt, флуоресцентно меченное красителем ALEXA 488, обозначаемое далее как ALEXA488-Bgt.

Конкурентный флуоресцентный анализ с использованием нХР электрического органа *Torpedo californica* проводили, как описано ранее [13]. Наряду с ядом мадагаскарской кошачьеглазой змеи *M. colubrinus* мы протестировали также яды щитомордника восточного *Glodyus blomhoffi*, щитомордника каменистого *G. saxatilis*, гадюки Орлова *Vipera orlovi*, желто-зеленой куфии *Protobothrops flavoviridis* и бушмейстера *Lachesis muta*. Как следует из полученных данных (рис. 1), заметную способность ингибировать связывание ALEXA488-Bgt с нХР *T. californica* проявили яд мадагаскарской кошачьеглазой змеи *M. colubrinus*, а также яды щитомордника восточного *G. blomhoffi* и щитомордника каменистого *G. saxatilis*. Яд мадагаскарской кошачьеглазой змеи *M. colubrinus* оказался одним из наиболее активных в отношении нХР мышечного типа, вытеснив 75% ALEXA488-Bgt при концентрации 2 мг/мл. Яд щитомордника восточного *G. blomhoffi* показал высокую активность, ингибируя 65% связывания ALEXA488-Bgt при концентрации 2 мг/мл. Яд щитомордника каменистого *G. saxatilis* проявил еще большую эффективность связывания с рецептором мышечного типа, полностью вытеснив ALEXA488-Bgt при концентрации 2 мг/мл.

На основании результатов, полученных с помощью метода флуоресцентного конкурентного анализа, можно сделать вывод о наличии в ядах компонентов, конкурирующих с ALEXA488-Bgt за связывание с нХР, но нельзя определить, выступают ли активные компоненты исследуемых ядов агонистами или антагонистами холинорецепторов. Дальнейшую работу было решено проводить с ядами, показавшими наиболее эффективное ингибирование связывания ALEXA488-Bgt с нХР *Torpedo*. Чтобы установить, влияют ли эти яды на функциональный ответ рецептора, мы провели их исследование методом кальциевого имиджинга. Исследование проводили на клеточных линиях эмбриональных почек человека HEK293 и нейробластомы мыши Neuro2a, трансфицированных плазмидами, кодирующими субъединицы мышечного нХР человека в соотношении $2\alpha 1 : 1\beta 1 : 1\delta : 1\epsilon$, а также кальциевый сенсор Case12. При активации рецептора через открывающийся канал кальций входит внутрь клетки и вызывает усиление флуоресценции сенсора. Сенсор позволяет напрямую оценивать изменения концентрации Ca^{2+} в диапазоне от нано- до микромолей с высоким отношением сигнала к шуму. Быстрое и обратимое связывание Case12 [16] с ионами кальция позволяет использовать сенсор для мониторинга уровня кальциевых осцилляций в клетке. В ответ на повышение концентрации

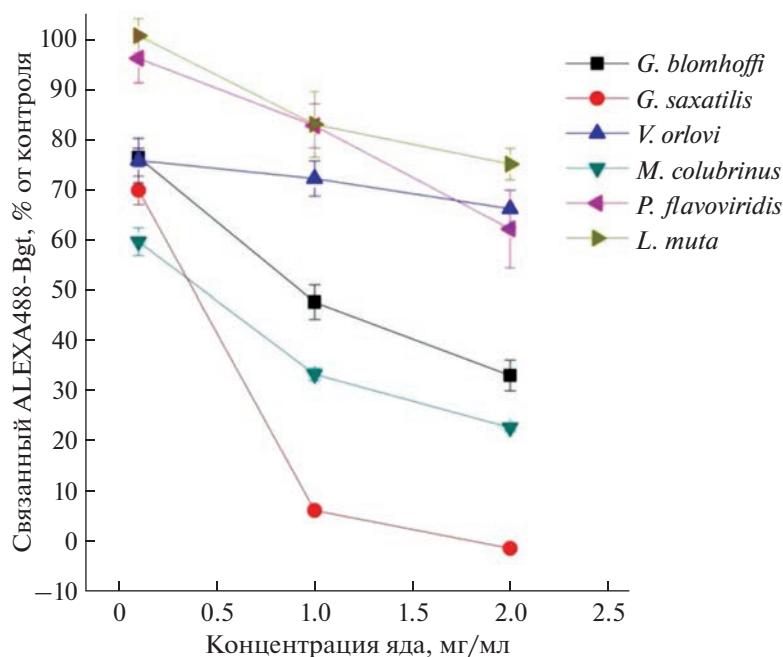


Рис. 1. Конкуренция ядов змей с ALEXA488-Bgt за связывание с нХР *T. californica*.

Ca^{2+} происходит увеличение интенсивности флуоресценции сенсора, которое может достигать 12-кратной величины.

Для исследования были выбраны клетки, ответившие на добавление 40 мкМ ацетилхолина увеличением эмиссии флуоресценции, что свидетельствовало о наличии на их поверхности экспрессированного рецептора. Далее проводили предварительную инкубацию клеток с ядами в течение 5 мин, добавляли ацетилхолин в такой же концентрации и оценивали изменение ответа на ацетилхолин. Результаты фиксировали для каждой отдельной клетки. Было установлено, что предварительная инкубация клеток исследуемых линий с ядом щитомордника каменистого *G. saxatilis* приводила к ингибированию ответа клеток на ацетилхолин на 73 и 85% для клеток линии НЕК293 и Neuro2a соответственно (рис. 2). При предварительной инкубации клеток с ядом мадагаскарской кошачьеглазой змеи *M. colubrinus* ингибирование ответа на ацетилхолин составило 75 и 100% для клеток линии НЕК293 и Neuro2a соответственно (рис. 2).

Таким образом, яды каменистого щитомордника и кошачьеглазой змеи ингибировали функциональный ответ мышечного нХР человека, проявив свойства конкурентных антагонистов. Результаты дальнейшего исследования яда каменистого щитомордника будут опубликованы отдельно. В данной работе яд кошачьеглазой змеи далее подвергали разделению методами жидкостной хроматографии для выделения активного компонента.

Выделение из яда кошачьеглазой змеи пептидного ингибитора нХР и определение его аминокислотной последовательности. Для выделения ингибитора сырой яд *M. colubrinus* разделяли с использованием трех стадий жидкостной хроматографии. На первом этапе использовали гель-фильтрацию на колонке с Superdex 75 (рис. 3а) и определяли способность полученных фракций конкурировать с α -Bgt за связывание с нХР *Torpedo*. Наиболее активной оказалась фракция II, которую затем разделяли с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (рис. 3б), у полученных фракций также определяли способность конкурировать с α -Bgt за связывание с нХР *Torpedo*. Наибольшую активность проявила фракция 18, которую дополнительно очищали с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием более плавного градиента концентрации ацетонитрила (рис. 4).

Фракция 5 (рис. 4) обладала способностью ингибировать связывание α -Bgt с нХР *Torpedo* и была подвергнута дальнейшему анализу. По данным масс-спектрометрии, молекулярная масса выделенного продукта составила 2786.3 Да. Эта масса соответствует пептиду длиной ~25 а.о. Учитывая этот факт, аминокислотную последовательность пептида определяли методом автоматической деградации по Эдману, используя секвенатор белков и пептидов PPSQ-33A (Shimadzu Corp., Япония). Установленная аминокислотная последовательность пептида, названного маколуксином (англ. macoluxin — от *Madagascarophis colubrinus*

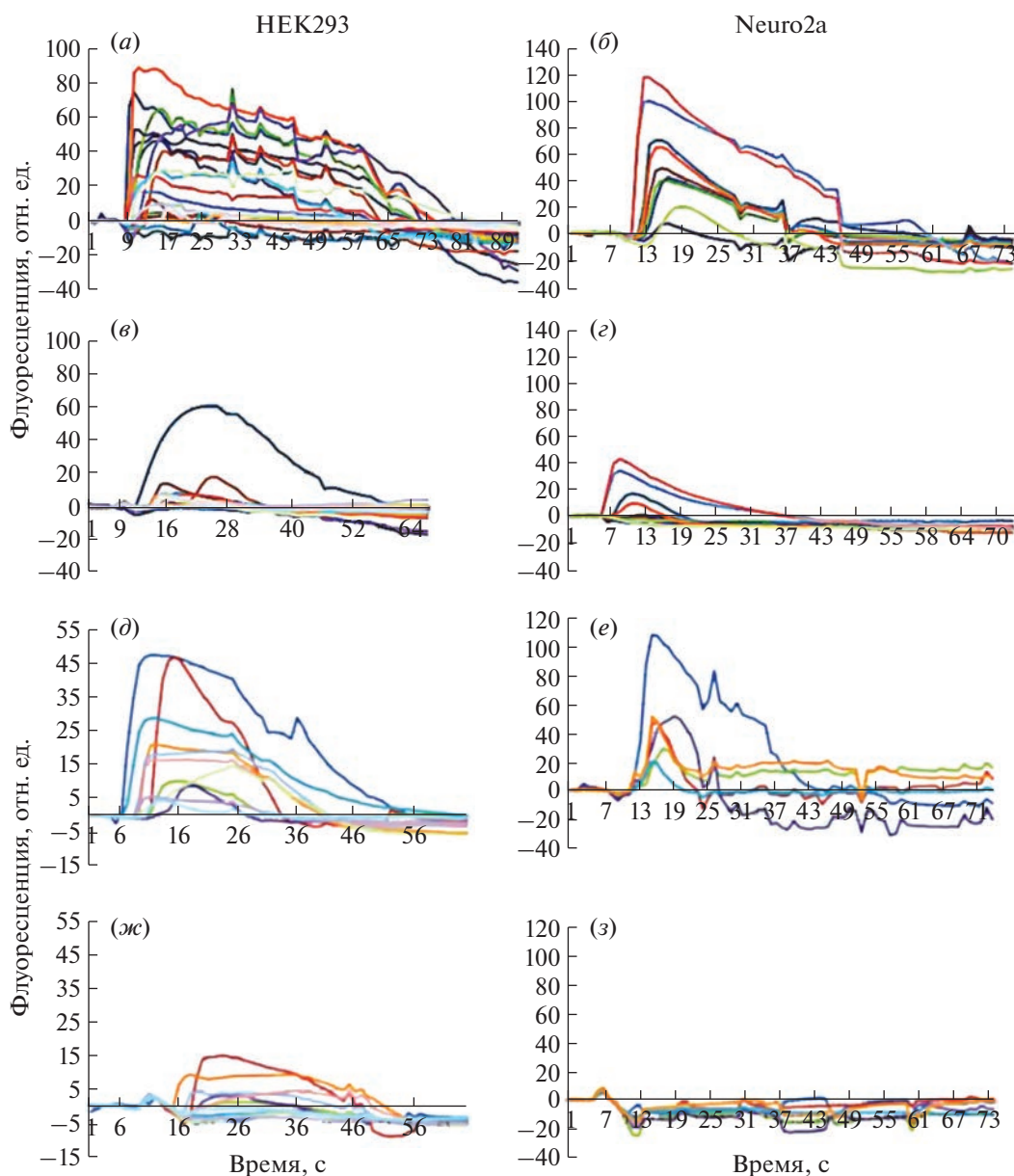


Рис. 2. Изменение интенсивности флуоресценции, соответствующее изменению внутриклеточной концентрации ионов кальция в клетках линий HEK293 и Neuro2a. Разными цветами представлены ответы, полученные от отдельных клеток. (а, б, д, е) — Ответ на инкубацию с 40 мкМ ацетилхолином в течение 5 с; (в, г, ж, з) — ответ на инкубацию с 40 мкМ ацетилхолином в течение 5 с после предварительной инкубации с ядом змей *G. saxatilis* (в, г) и *M. colubrinus* (ж, з) в течение 5 мин.

toxin), приведена на рис. 5а. Расчетная молекулярная масса маколуksина составила 2786.2 Да, в пределах ошибки она совпадает с экспериментально установленной величиной. Далее был проведен поиск гомологичных аминокислотных последовательностей в неповторяющихся базах данных белковых последовательностей, включая GenBank, PDB, SwissProt, PIR и PRF, с использованием алгоритма BLAST [17] (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Результаты поиска показали, что маколуksин гомологичен фрагменту аминокислотной после-

довательности металлопротеиназ ядов змей различных семейств (рис. 5б). При этом степень сходства очень высокая и достигает 91%. Интересно, что в пространственной структуре металлопротеиназ этот фрагмент образует α -спираль, расположенную на поверхности белковой глобулы (например, структура 3K7N_A [18]). Этим, возможно, объясняется выщепление фрагмента такого размера. Интересно отметить, что ранее пептиды Pm1 и Pm2, обладающие способностью ингибировать нХР, были идентифицированы в

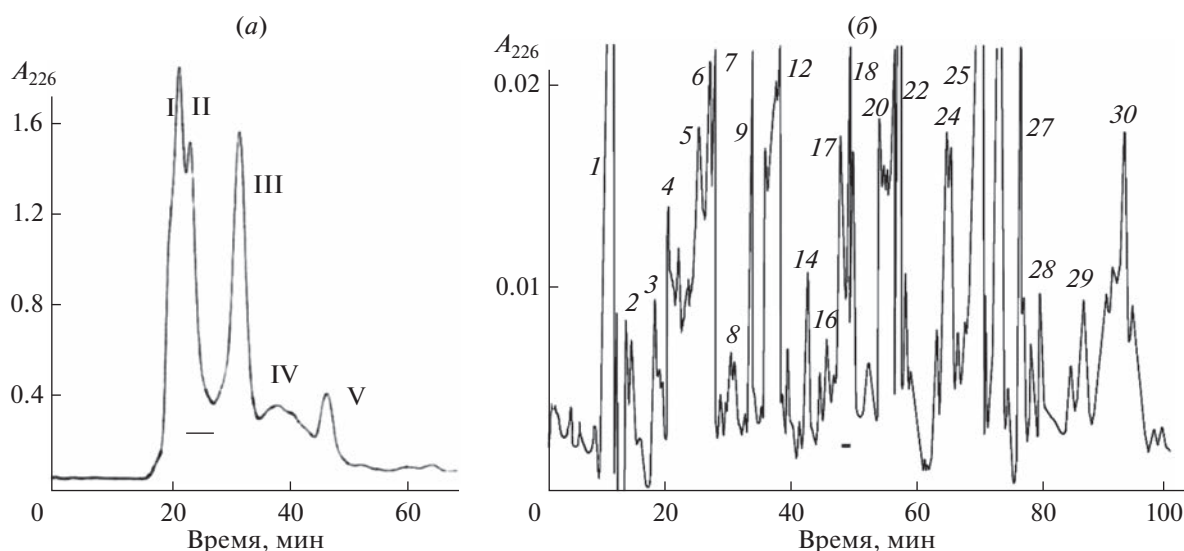


Рис. 3. Выделение активного соединения из яда *M. colubrinus*: (а) — гель-фильтрация на колонке Superdex 75 (10 × 300 мм), уравновешенной 0.1 М ацетатом аммония (pH 6.2), при скорости потока 0.5 мл/мин; (б) — разделение фракции II методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке Jupiter C18 (10 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила 10–55% за 90 мин при скорости потока 2 мл/мин. Горизонтальные линии под пиками обозначают активные фракции.

пропептидном домене металлопротеиназы оливковой песчаной змеи *Psammophis mossambicus* при анализе эволюции генов этих многофункциональных ферментов [19]. В процессе биосинтеза пропептидный домен отщепляется от белка-предшественника с образованием зрелой металлопротеиназы, обладающей протеолитической активностью. Ферменты, участвующие в процессинге белков змеиного яда, мало изучены; в частности, неизвестно, какие протеазы отщепляют пропептидный домен. Металлопротеиназы широко распространены в змеиных ядах, в некоторых ядах их содержание очень высоко, однако данные об идентификации фрагментов пропептидных доменов в ядах весьма ограничены. Такие фрагменты были, в частности, обнаружены при протеомном анализе яда *Bothrops jararaca* [20]. Что касается пептидов Pm1 и Pm2, данные о наличии этих соединений в яде змеи *P. mossambicus* отсутствуют. Эта змея, подобно *M. colubrinus*, также заднебороздчатая, но принадлежит семейству Psammophiidae. Поскольку маколуксин и пептиды Pm1 и Pm2 идентифицированы в разных доменах металлопротеиназ, гомология между ними отсутствует. Тем не менее обнаружение этих нейротоксичных пептидов свидетельствует о том, что крупные белки ядов могут выступать в качестве предшественников пептидов, обладающих иной активностью, нежели исходный токсин. В частности, металлопротеиназы (фрагментом одной из которых, по-видимому, является маколуксин) представляют собой группу многодоменных белков, проявляющих несколько видов биологиче-

ской активности, таких как способность вызывать геморрагию, протеолитическую деградацию фибриногена и фибрина, индукцию апоптоза и ингибирование агрегации тромбоцитов. Данных

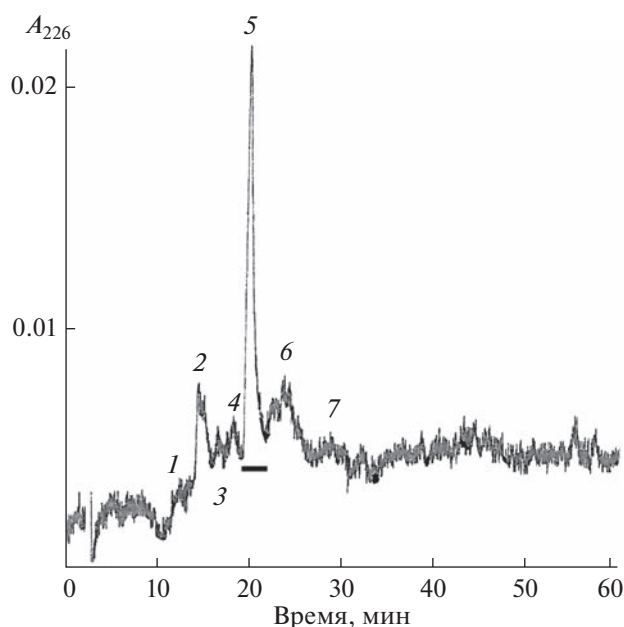


Рис. 4. Разделение фракции 18 (рис. 3б) методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке Jupiter C18 (4.6 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила 20–30% за 60 мин при скорости потока 1 мл/мин. Горизонтальная линия обозначает активную фракцию.

(a)				
1	10	20		
LKSFGEWRKTDLLPRKRNDNAQL				
(б)				
		Идентичность, %	Идентификатор в GenBank	
1	LKSFGEWRKTDLLPRKRNDNAQL	23	100	Маколуksин
274	LKSFGEWRKTVLLPRRRNDNAQL	296	91	QSI84039.1
274	LNSFGEWRKTVLLPRKRNDNAQL	296	91	ABK63559.1
274	LKSFGEWRET VLLPRKRNDNAQL	296	91	D6PXE8.1
268	LKFFGNWRKTDLLNRKRHDNAQL	290	83	KAG5858171.1
262	LDSFGEWRKTDLLNRKSHDNAQL	284	83	Q8QG89.1
267	LNAFGEWRKTDLLTRKKHDNAQL	289	78	Q2QA02.1

Рис. 5. (a) — Аминокислотная последовательность маколуksина; (б) — выравнивание аминокислотной последовательности маколуksина с гомологичными фрагментами известных белков: QSI84039.1 — металлопротеиназа *Calliophis bivirgatus*; ABK63559.1 — металлопротеиназа *Demansia vestigiata*; D6PXE8.1 — цинк-металлопротеиназа-дезинтегрин-подобная АТРаза В *Naja atra*; KAG5858171.1 — металлопротеиназа *Bothrops jararaca*; Q8QG89.1 — металлопротеиназа BITM02A *Bothrops insularis*; Q2QA02.1 — металлопротеиназа *Crotalus durissus durissus*.

о нейротоксической активности металлопротеиназ обнаружить не удалось.

Как указывалось во введении, ранее в ядах заднебороздчатых змей были идентифицированы трехпетельные токсины — блокаторы нХР [4–6]. Эти токсины представляют собой белки с молекулярной массой ~10 кДа и содержат пять дисульфидных связей, в то время как в маколуksине дисульфидные связи отсутствуют. Близких структурных аналогов маколуksина среди токсинов, действующих на нХР, обнаружить не удалось. Следует отметить, что помимо Pm1 и Pm2, пептиды, ингибирующие нХР и не содержащие дисульфидные связи, ранее были выделены нами из ядов бирманской гадюки *Azemiops feae* (пептид аземиопсин) [11] и шумящей гадюки *Bitis arietans* (пептиды баптиды) [12]. Однако эти змеи, в отличие от *M. colubrinus*, относятся к семейству Viperidae. Еще один пример пептидов, не содержащих дисульфидных связей и ингибирующих нХР, — конорфамиды из яда мексиканской морской улитки *Conus austini* [21]. Все эти пептиды, за исключением баптидов, характеризуются высоким содержанием основных аминокислот, но при этом гомология между ними отсутствует.

Взаимодействие маколуksина с нХР. Для более детального изучения биологической активности пептид маколуksин получали методом твердофазного пептидного синтеза. Чистоту полученного пептида подтверждали методом аналитической обращенно-фазовой хроматографии, а структуру — методом масс-спектрометрии.

Эффективность взаимодействия маколуksина с нХР оценивали по его конкуренции с радиоак-

тивным α -бунгаротоксином (^{125}I - αBgt) за связывание с мембранами электрического органа ската *T. californica*, содержащими рецепторы мышечно-го типа ($\alpha_1\beta_1\gamma\delta$), и с клетками линии GH_4C_1 , экспрессирующими нейронные нХР типа $\alpha 7$ человека. При этом установлено, что пептид ингибирует связывание ^{125}I - αBgt с мембранами *Torpedo* с величиной $\text{IC}_{50} = 46.8 \pm 3.9$ мкМ (рис. 6). Маколуksин в концентрации 50 мкМ не ингибировал связывание ^{125}I - αBgt с $\alpha 7$ нХР, а при концентрации 100 мкМ ингибирование составило лишь 10%. Интересно, что в отличие от маколуksина, ранее упоминавшиеся пептиды Pm1 и Pm2 ингибировали нХР типа $\alpha 7$ человека, показывая величины $\text{IC}_{50} \sim 12$ мкМ [19].

Чтобы проверить, служит ли маколуksин функциональным ингибитором нХР, были проведены электрофизиологические эксперименты с использованием нХР мышечного типа, гетерологически экспрессированного в ооцитах шпорцевой лягушки. Пептид сам по себе ионных токов не индуцировал. Однако маколуksин ингибировал ток, вызванный ацетилхолином (рис. 7). При этом его ингибирующий эффект полностью исчезал после стандартной отмывки длительностью 5 мин. Следовательно, маколуksин — обратимый антагонист нХР мышечного типа.

Таким образом, из яда кошачьеглазой змеи *M. colubrinus* выделен пептид маколуksин, обладающий способностью обратимо ингибировать нХР мышечного типа. Маколуksин имеет высокую степень подобия с фрагментом металлопротеиназы змеиного яда и, по-видимому, образуется в результате протеолиза этого фермента.

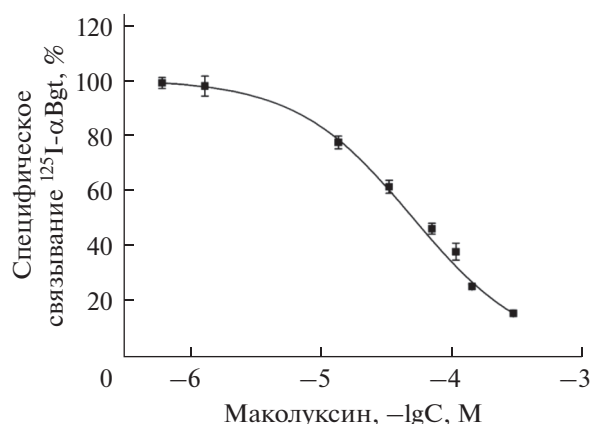


Рис. 6. Ингибирование связывания радиоактивного α -Bgt с нХР *T. californica* маколуksином ($IC_{50} = 46.8 \pm 3.9$ мкМ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Мембраны *Torpedo californica* любезно предоставлены проф. Ф. Хухо (Свободный Университет Берлина, Германия). α -Bgt, меченный ALEXA 488 (ALEXA488-Bgt), был приобретен у Thermo Fisher Scientific (Waltham, США). Все использованные в работе реактивы имели чистоту “ч.д.а.” или выше.

Получение яда *M. colubrinus*. Яд получали от экземпляров *M. colubrinus*, содержащихся в серпентарии ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН. После отбора яд высушивали над безводным $CaCl_2$ и хранили при $-20^\circ C$.

Выделение пептида. Яд растворяли в 0.1 М ацетате аммония (pH 6.2) и наносили на колонку с Superdex 75 (10×300 мм; Cytiva, США), уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили при скорости потока 0.5 мл/мин. Оптическую плотность элюента регистрировали при 226 нм с исполь-

зованием проточного УФ-детектора Uvocord SII (ЛКВ, Швеция). Фракцию II (рис. 3а) лиофилизировали и далее разделяли методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке Jupiter C18 (10×250 мм; Phenomenex, США) в градиенте ацетонитрила 0–55% в течение 90 мин в присутствии 0.1% трифторуксусной кислоты при скорости потока 2 мл/мин (рис. 3б). Фракцию 18 (рис. 3б) лиофилизировали и дополнительно очищали методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке Jupiter C18 (4.6×250 мм; Phenomenex, США) в градиенте ацетонитрила 20–30% за 60 мин в присутствии 0.1% трифторуксусной кислоты при скорости потока 1 мл/мин (рис. 4).

Определение аминокислотной последовательности. Первичную структуру пептида определяли методом деградации по Эдману с помощью автоматического секвенатора белков и пептидов PPSQ-33A (Shimadzu Corp., Япония) по протоколу производителя.

Пептидный синтез. Пептид маколуksин синтезировали по методике, описанной ранее [22].

Биологическая активность маколуksина. Конкурентный флуоресцентный анализ. Все опыты проводили в 96-луночном круглодонном планшете с низкой сорбцией (MICROTEST TM U-Bottom, Thomas Scientific, США). Буфер для связывания имел следующий состав: 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1.46 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ Na_2HPO_4 , 0.1% Tween-20, pH 7.4. В лунки планшета вносили исследуемый раствор мембран в концентрации 0.125 мкг/мл белка (0.31 нМ токсин-связывающих участков), инкубировали в течение часа в 100 мкл буфера для связывания с ядами *G. blomhoffi*, *G. saxatilis*, *V. orlovi*, *M. colubrinus*, *P. flavoridis* и *L. muta* в диапазоне концентраций 0.1–2.0 мг/мл. Далее добавляли 20 мкл ALEXA488-Bgt в буфере для связывания в конечной концентрации 0.293 пМ, инкубацию продолжали еще 5 мин. Реакцию останавливали фильтрацией на фильтрах

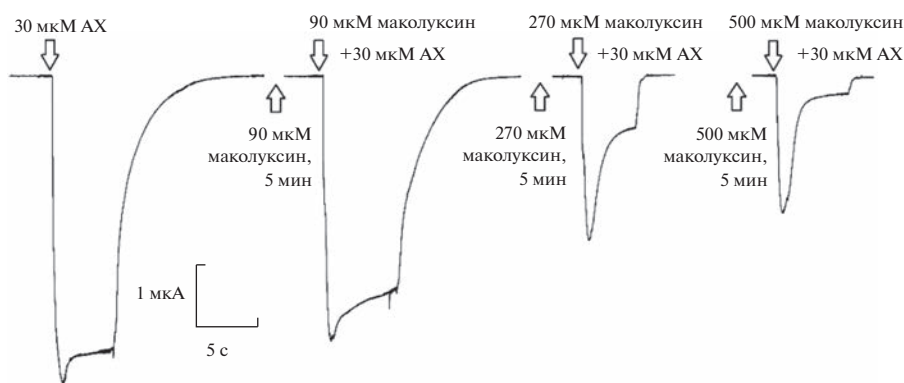


Рис. 7. Ингибирование маколуksином токов, индуцируемых ацетилхолином (AX) в нХР мышечного типа. Регистрировали ответ ооцита на добавление 30 мкМ ацетилхолина, далее шла отмывка (не менее 5 раз по 100 мкл), инкубация с маколуksином (5 мин) и добавление маколуksина в смеси с 30 мкМ ацетилхолином.

GF/C (Whatman, Великобритания), предварительно замоченных в растворе 0.5%-ного полиэтиленimina, и промывали холодным буфером для связывания 3 раза по 200 мкл. Количество связавшегося ALEXA488-Bgt определяли на флуориметре ФФМ-01 (ООО "Кортек", Россия). Длина волны возбуждающего света составляла 482 нм, регистрацию сигнала проводили при длине волны 538 нм. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 200-кратного избытка α -кобратоксина. Каждый эксперимент проводили дважды в четырех повторах.

Для построения графиков использовали программу OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, США).

Культивирование клеток и их транзистентная трансфекция. Для трансфекции использовали клетки нейробластомы мыши Neuro2a и почек эмбриона человека HEK293. Клетки получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки (HyClone, США), 5 мМ L-глутамин, гентамицин (10 мкг/мл) и амфотерицин В (0.25 мкг/мл). Культуру клеток выращивали в инкубаторе MCO-15AC (5% CO₂, 37°C; Sanyo, Япония).

Трансфекцию клеток проводили с помощью Липофектамина 2000 (Invitrogen, США). Плазмиды, кодирующие субъединицы мышечного nHR, были любезно предоставлены проф. В. Витцеманном (Институт медицинских исследований Макса Планка, Германия). Смесь для трансфекции содержала 250 мкл DMEM без сыворотки, 2.5 мкл Липофектамина 2000, 1 мкг смеси ДНК плазмид субъединиц мышечного nHR мыши (в соотношении 2 α 1 : 1 β 1 : 1 δ : 1 ϵ) и 1 мкг ДНК кальциевого сенсора Case12 (Евроген, Россия). Для достижения оптимального уровня экспрессии nHR на поверхности клеток эксперименты по кальциевому имиджингу проводили через 72 ч после трансфекции.

Детекция изменений внутриклеточной концентрации кальция под воздействием ядов *G. saxatilis* и *M. colubrinus*. Для определения внутриклеточного содержания ионов кальция использовали генетически кодируемый сенсор Case12 (Евроген, Россия). Детекцию изменения внутриклеточного содержания кальция проводили при 516 нм.

Изображения регистрировали с помощью кварцевого объектива Planc N (20 $\times$ /0.40) CCD-камерой Olympus XM-10 (Hamamtsu, Япония). Сбор и хранение изображений в режиме реального времени осуществляли с помощью программы Cell-A (Olympus, Япония), последующую обработку — с использованием программ ImageJ, OriginPro 7.5, Microsoft Office Excel. Изменения интенсивности флуоресценции клеток фиксировали видеокамерой XM10 (Olympus, Япония) при выдержке

500 мс. Объем камеры с клетками составлял ~300 мкл, что обеспечивало полную замену раствора в камере не более чем за 15 с.

К клеткам добавляли раствор 40 мкМ ацетилхолина в 1 мл наружного раствора (140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES, 10 мМ глюкоза, pH 7.4), с последующей трехкратной отмывкой тем же раствором. После чего 5 мин инкубировали клетки с ядами и снова добавляли 40 мкМ ацетилхолин. Результаты фиксировали для каждой отдельной клетки.

Изменения ответа для каждой отдельной клетки рассчитывали по формуле:

$$100 - (A_o / A_k \times 100),$$

где A_o — амплитуда ответа клетки на ацетилхолин после 5-минутной инкубации с ядом, A_k — амплитуда ответа клетки на ацетилхолин в предварительном эксперименте.

Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка. По полученным индивидуальным значениям изменения ответа рассчитывали среднее изменение в процентах.

Конкурентный радиолигандный анализ. Для экспериментов по конкурентному связыванию суспензию мембран электрического органа *T. californica* (в конечной концентрации 1.2 нМ α -бунгаротоксин-связывающих участков) или клеток GH4C1 (0.4 нМ α -бунгаротоксин-связывающих участков) в 20 мМ Tris-HCl-буфере, pH 8.0, содержащем бычий сывороточный альбумин в концентрации 1 мг/мл, инкубировали 90 мин с различными концентрациями пептида. Затем добавляли радиоактивный [¹²⁵I]-меченый α -Bgt (500 Ки/ммоль) до получения конечной концентрации 0.2–0.4 нМ и инкубировали еще 5 мин. Определение неспецифического связывания, фильтрацию образцов и подсчет связавшейся радиоактивности проводили, как описано ранее [23].

Электрофизиологические измерения. Электрофизиологические измерения на ооцитах *Xenopus* проводили, как описано ранее [23]. Ооциты предварительно инкубировали с различными концентрациями маколуксина в течение 5 мин перед его совместным нанесением с ацетилхолином. Чтобы проверить обратимость ингибирования nHR маколуксином, рецептор инкубировали с маколуксином в течение 5 мин. Затем ооциты промывали буфером и через 5 мин измеряли ток, вызванный 30 мкМ ацетилхолином.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ способности ядов нескольких видов змей семейств Viperidae и Lamprophiidae ингибировать nHR впервые показал, что яд заднебороздчатой кошачьеглазой змеи

M. colubrinus семейства Lamprophiidae обладает такой способностью. С использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии из яда *M. colubrinus* выделен пептид маколуksин, ингибирующий нХР мышечного типа, и определена его аминокислотная последовательность. Поиск гомологичных аминокислотных последовательностей в базах данных известных белков показал, что последовательность маколуksина имеет высокую степень сходства (идентичность 91%) с участком последовательности металлопротеиназ ядов змей. Этот фрагмент металлопротеиназы имеет α -спиральную структуру и расположен на поверхности белковой глобулы. Маколуksин был получен в препаративных количествах методом твердофазного пептидного синтеза. Исследование его биологической активности показало, что он конкурирует с α -Bgt за связывание с нХР *Torpedo*, при этом величина IC_{50} составляла 47 мкМ. Пептид маколуksин в концентрации до 50 мкМ не конкурировал с α -Bgt за связывание с $\alpha 7$ нХР. При концентрации в диапазоне сотен микромолей маколуksин ингибировал токи, вызываемые ацетилхолином в нХР мышечного типа. Эффект ингибирования был легко обратим при отмывке в течение 5 мин.

Таким образом, нами впервые в яде заднебрюшной змеи идентифицирован и охарактеризован пептид, ингибирующий нХР мышечного типа. Наши данные свидетельствуют о том, что белки яда могут выступать в качестве предшественников пептидных токсинов, обладающих иным видом биологической активности.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д.х.н. С.А. Козлову (ИБХ РАН) за определение аминокислотной последовательности маколуksина методом автоматической деградации по Эдману и к.б.н. Д.С. Лебедеву за проведение электрофизиологических экспериментов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00769).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры со змеями одобрены Комиссией по содержанию и использованию лабораторных животных ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН (протокол-заявка № 324/2021 от 23 июня 2021 г.).

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Madagascarophis colubrinus* (Schlegel, 1837) // The Reptile Database, 2022. https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Madagascarophis&species=colubrinus&search_param=%28%28genus%3D%27madagascarophis%27%29%29
2. Domergue C.A. // Bull. Mus. Natn. Hist. Nat., Paris. 1987. V. 9. P. 455–489.
3. Domergue C.A. // Bull. Acad. Malgache. 1962. V. 40. P. 97–98.
4. Dashevsky D., Debono J., Rokyta D., Nouwens A., Josh P., Fry B.G. // J. Mol. Evol. 2018. V. 86. P. 531–545. <https://doi.org/10.1007/s00239-018-9864-6>
5. Heyborne W.H., Mackessy S.P. // Biochimie. 2013. V. 95. P. 1923–1932. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.025>
6. Calvete J.J., Bonilla F., Granados-Martínez S., Sanz L., Lomonte B., Sasa M. // J. Proteomics. 2020. V. 225. P. 103882. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103882>
7. Xie B., Dashevsky D., Rokyta D., Ghezellou P., Fathinia B., Shi Q., Richardson M.K., Fry B.G. // BMC Biol. 2022. V. 20. P. 4. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01208-9>
8. Koua D., Ebou A., Habbouche Z., Ballouard J.M., Caron S., Bonnet X., Dutertre S. // Toxicon X. 2022. V. 15. P. 100130. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2022.100130>
9. Vulfius C.A., Kasheverov I.E., Starkov V.G., Osipov A.V., Andreeva T.V., Filkin S.Y., Gorbacheva E.V., Astashev M.E., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // PLoS One. 2014. V. 9. P. e115428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115428>
10. Vulfius C.A., Kasheverov I.E., Kryukova E.V., Spirova E.N., Shelukhina I.V., Starkov V.G., Andreeva T.V., Faure G., Zouridakis M., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // PLoS One. 2017. V. 12. P. e0186206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186206>
11. Utkin Y.N., Weise C., Kasheverov I.E., Andreeva T.V., Kryukova E.V., Zhmak M.N., Starkov V.G., Hoang N.A., Bertrand D., Ramerstorfer J., Sieghart W., Thompson A.J., Lummis S.C., Tsetlin V.I. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. P. 27079–27086. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.363051>
12. Vulfius C.A., Spirova E.N., Serebryakova M.V., Shelukhina I.V., Kudryavtsev D.S., Kryukova E.V., Starkov V.G., Kopylova N.V., Zhmak M.N., Ivanov I.A., Kudryashova K.S., Andreeva T.V., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // Toxicon. 2016. V. 121. P. 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.020>
13. Kryukova E.V., Vulfius C.A., Ziganshin R.H., Andreeva T.V., Starkov V.G., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // J. Venom Res. 2020. V. 10. P. 23–29.

14. Dutertre S., Nicke A., Tsetlin V.I. // *Neuropharmacology*. 2017. V. 127. P. 196–223.
https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.06.011
15. Kudryavtsev D.S., Shelukhina I.V., Son L.V., Ojomoko L.O., Kryukova E.V., Lyukmanova E.N., Zhmak M.N., Dolgikh D.A., Ivanov I.A., Kasheverov I.E., Starkov V.G., Ramerstorfer J., Sieghart W., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 22747–22758.
https://doi.org/10.1074/jbc.M115.648824
16. Shelukhina I., Spirova E., Kudryavtsev D., Ojomoko L., Werner M., Methfessel C., Hollmann M., Tsetlin V. // *PLoS One*. 2017. V. 12. P. e0181936.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181936
17. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3389–3402.
https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389
18. Guan H.H., Goh K.S., Davamani F., Wu P.L., Huang Y.W., Jeyakanthan J., Wu W.G., Chen C.J. // *J. Struct. Biol.* 2010. V. 169. P. 294–303.
https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.11.009
19. Brust A., Sunagar K., Undheim E.A., Vetter I., Yang D.C., Casewell N.R., Jackson T.N., Koludarov I., Alewood P.F., Hodgson W.C., Lewis R.J., King G.F., Antunes A., Hendrikx I., Fry B.G. // *Mol. Cell. Proteomics*. 2013. V. 12. P. 651–663.
https://doi.org/10.1074/mcp.M112.023135
20. Nicolau C.A., Carvalho P.C., Junqueira-de-Azevedo I.L., Teixeira-Ferreira A., Junqueira M., Perales J., Neves-Ferreira A.G., Valente R.H. // *J. Proteomics*. 2017. V. 151. P. 214–231.
https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.029
21. Jin A.H., Cristofori-Armstrong B., Rash L.D., Román-González S.A., Espinosa R.A., Lewis R.J., Alewood P.F., Vetter I. // *Biochem. Pharmacol.* 2019. V. 164. P. 342–348.
https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.04.025
22. Shelukhina I.V., Zhmak M.N., Lobanov A.V., Ivanov I.A., Garifulina A.I., Kravchenko I.N., Rasskazova E.A., Salnova M.A., Tukhovskaya E.A., Rykov V.A., Slashcheva G.A., Egorova N.S., Muzyka I.S., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // *Toxins (Basel)*. 2018. V. 10. P. 34.
https://doi.org/10.3390/toxins10010034
23. Lebedev D.S., Kryukova E.V., Ivanov I.A., Egorova N.S., Timofeev N.D., Spirova E.N., Tufanova E.Y., Siniavin A.E., Kudryavtsev D.S., Kasheverov I.E., Zouridakis M., Katsarava R., Zavrashvili N., Iagorshvili I., Tzartos S.J., Tsetlin V.I. // *Mol. Pharmacol.* 2019. V. 96. P. 664–673.
https://doi.org/10.1124/mol.119.117713

A New Peptide from the Venom of the Madagascar Cat-Eyed Snake *Madagascarophis colubrinus* Blocks Nicotinic Acetylcholine Receptor

E. V. Kryukova*, D. A. Ivanov**, N. V. Kopylova*, V. G. Starkov*, T. V. Andreeva*, I. A. Ivanov*,
V. I. Tsetlin*, and Yu. N. Utkin*,#

#Phone: +7 (495) 336-65-22; e-mail: utkin@ibch.ru; yutkin@yandex.ru

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

**FKOO “Labcorp”, ul. Trubnaya 12, Moscow, 107045 Russia

In screening the venoms of various snake species, we found that the venom of the Madagascar cat-eyed snake *Madagascarophis colubrinus* competes with α -bungarotoxin for binding to the nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. Using liquid chromatography, a peptide, called macoluxin and inhibiting the binding of the toxin to the receptor, was isolated from the venom. The amino acid sequence of this 23-amino acid peptide was determined by automatic Edman degradation. Comparison with amino acid sequences of known proteins showed that the macoluxin sequence is homologous to the α -helical region of the sequence of snake venom metalloproteinases. The peptide was synthesized by solid-phase peptide synthesis, and the study of its biological activity showed that it inhibits the binding of α -bungarotoxin to the *Torpedo* receptor with an IC_{50} of 47 μ M. Macoluxin also reversibly inhibited acetylcholine-induced currents in the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor. This is the first data on the presence in the venom of rear fanged snakes of a peptide that can inhibit the nicotinic acetylcholine receptor.

Keywords: Madagascar cat-eyed snake, venom, nicotinic acetylcholine receptor, peptide, inhibitor, macoluxin



ОСОБЕННОСТИ КОМПЛЕКСОВ САМООРГАНИЗУЮЩИХСЯ ПЕПТИДОВ H-(RADA)₄-OH СО СЛОЯМИ В *syn*- И *anti*-ОРИЕНТАЦИИ¹

© 2023 г. А. В. Данилкович*, #, Д. А. Тихонов**, ***, В. М. Липкин*

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

**Институт математических проблем биологии РАН – филиал Института прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН, Россия, 142290 Пущино, ул. проф. Виткевича, 1

***Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Россия, 142290 Пущино, ул. Институтская, 3

Поступила в редакцию 28.11.2022 г.

После доработки 23.12.2022 г.

Принята к публикации 24.12.2022 г.

Молекулы пептида H-(RADA)₄-OH в водно-солевых растворах способны образовывать двуслойные фибриллы в виде биотропного материала, который пригоден в качестве подложки для роста и дифференцировки клеток позвоночных. В филаменте два β-слоя взаимодействуют гидрофобными поверхностями, сформированными метильными группами остатков аланина. Заряженные группы остатков аргинина и аспарагиновой кислоты экспонированы вовне, при этом пептиды, составляющие филамент, находятся в β-конформации. Методом молекулярной динамики изучали изменения во времени геометрии комплексов 24 пептидов H-(RADA)₄-OH при 80 и 300 К. Определено, что комплекс антипараллельных пептидов наиболее стабилен, характеризуется наименьшими величинами свободной энергии и среднеквадратичного отклонения координат атомов (RMS) при 80 и 300 К. Впервые охарактеризована модель стабильной структуры комплекса 24 параллельных пептидов, состоящего из двух β-слоев в *syn*-ориентации. Наличие нескольких стабильных комплексов пептидов, имеющих разную компоновку молекул H-(RADA)₄-OH в составе протофиламента, подчеркивает важность изучения способов самоорганизации пептидов в растворе.

Ключевые слова: самоорганизация, матрикс, структура филамента, полярные пептиды, H-(RADA)₄-OH

DOI: 10.31857/S0132342323030107, **EDN:** PDPGKU

ВВЕДЕНИЕ

Самоорганизующиеся полярные пептиды представляют собой амфифильные структуры, нековалентно взаимодействующие друг с другом и образующие сложные надмолекулярные комплексы при физиологических условиях, при этом стабилизирующую роль играют как гидрофобные взаимодействия, так и водородные свя-

зи [1]. Учитывая растущий интерес к получению новых материалов для биомедицины, искусственный матрикс на основе самоорганизующихся пептидов рассматривается в качестве возможной основы для тканеспецифичной среды при формировании компонентов тканей и воссоздании трехмерных участков органов [2]. В этой связи пептид H-(RADA)₄-OH занимает особое место, выступая исторически первым примером синтетического соединения, способного формировать филаменты шириной ~5 нм и длиной в сотни нанометров, образуя биогель с высокой степенью обводненности (>98%) [3]. Материал, полученный на основе самоорганизующихся пептидов типа H-(RADA)₄-OH, обладает высокой стабильностью к температурным и механическим воздействиям, устойчив в широком диапазоне значений pH 2.0–10.0. Искусственный матрикс обладает биотропностью в отношении клеток эукариот разных типов, включая стволовые клетки [4]. Таким образом биогель, формируемый пептидами H-(RADA)₄-OH, может быть

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: H-(RADA)₄-OH – пептид RADARADA-RADARADA; DAN24 – комплекс 24 антипараллельных пептидов H-(RADA)₄-OH; DS24 – комплекс 24 параллельных пептидов, смещенных в вертикальной плоскости относительно друг друга, с β-слоями в *syn*-ориентации; DPN24 – комплекс 24 параллельных пептидов с β-слоями в *anti*-ориентации; DSS24 – комплекс 24 параллельных пептидов с β-слоями в *syn*-ориентации; NDSS24 – комплекс 24 параллельных пептидов, смещенных в двух плоскостях относительно друг друга, с β-слоями в *syn*-ориентации; RMS – среднеквадратичное отклонение координат атомов.

Автор для связи: (тел.: +7 (985) 360-02-92; эл почта: danilkovich@bibch.ru).

использован не только в медицине для регенерации тканей, но и в качестве “подложки” при культивировании линий клеток-продуцентов на биотехнологических производствах, используемых для наработки разнообразных веществ [5].

Смесь самоорганизующихся пептидов с химическими веществами, имеющими ограниченную растворимость в воде, позволяет получать биогель с функцией “хранилища” слаборастворимой субстанции, обеспечивая сравнительно низкую скорость диффузии в окружающую среду “инкорпорированного” вещества. Подобная система на основе биогеля может использоваться в качестве искусственного “депо” лекарственных средств применительно к комбинированной клеточной терапии болезней, предполагающей использование веществ с ограниченной растворимостью в водной среде [2, 6].

Пептид $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$ — продукт химического синтеза, что подразумевает возможность модификации последовательности остатков аминокислот, в том числе дополнения молекулы пептида функциональными участками типа $-\text{RGD}$, $-\text{YIGSR}$ или $-\text{IKVAV}$, соответствующими элементам контактных структур белков внешней мембраны клетки и определяющими определенный тип клеточных взаимодействий [2]. Это позволяет формировать функциональные элементы на поверхности филаментов, получая искусственный матрикс с более выраженным родством к клеткам позвоночных, экспрессирующим на внешней мембране соответствующие рецепторы [5].

Участки белка с чередующимися заряженными и гидрофобными аминокислотными остатками были обнаружены у дрожжей более 30 лет назад [7]. Следует отметить, что несмотря на сравнительно долгую историю изучения полярных самоорганизующихся пептидов, тонкая организация филамента, сформированного пептидами $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$, на данный момент до конца не выяснена. Первичная структура пептида $\text{H}-(\text{RADARADARADARADA})\text{-OH}$ характеризуется чередующимися противоположно заряженными аминокислотными остатками, разделенными гидрофобными остатками аланина [8]. Эта особенность строения, а именно чередование гидрофильных и гидрофобных групп, определяет наряду с гидрофобными взаимодействиями возможность реализации межмолекулярных водородных связей и электростатических взаимодействий по типу ионных пар или так называемых “солевых мостиков”.

Амфифильный синтетический пептид $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$ в составе комплекса находится в виде β -складчатой структуры, стабилизированной водородными связями между пептидными остовами соседних молекул по всей длине

филамента [9, 10]. В водном растворе молекулы пептида $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$ существуют преимущественно в конформации α -спирали [11], но способны быстро агрегировать при добавлении соли, образуя стабильные комплексы в виде протяженных (до сотен нанометров) филаментов. В результате самоорганизации полярных пептидов типа $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$ образуются водородные связи между пептидными остовами соседних молекул, находящимися в β -конформации [9]. Заряженные боковые заместители аминокислотных остатков R и D при этом экспонированы по одну сторону β -листа, а метильные группы остатков A — по другую [10]. В этом случае на одной стороне β -складки образуется обширная гидрофобная поверхность, сформированная метильными группами боковых заместителей остатков аланина, существование которой в полярном окружении затруднено. Поэтому в водном растворе гидрофобные поверхности двух β -слоев пептидов $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$ замыкаются друг на друга, образуя филамент с трехслойной структурой, в которой заряженные боковые заместители аминокислотных остатков экспонированы наружу, а гидрофобные метильные группы формируют внутреннюю прослойку филамента, контактирующую с полярным окружением только на торцевых поверхностях филамента.

Детали процесса перехода мономеров пептидов $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$ из раствора в состав комплекса, а также взаимная ориентация пептидов внутри β -слоя филамента до конца не выяснены. Тем не менее известно, что наиболее протяженные филаменты образуются при физиологических значениях pH и концентрациях солей не более 0.5 М, причем не только в простых водных растворах, но и в биогенных жидкостях, таких как плазма крови или цереброспинальная жидкость [12, 13]. Механические свойства биогелей, получаемых на основе полярных комплементарных пептидов, могут в некоторой степени различаться в зависимости от типа аниона, присутствующего в составе соединения вследствие добавления к исходному раствору пептида для инициации гелеобразования, что косвенно подтверждает роль, которую анионы играют в процессах формирования пространственных структур на основе биомолекул [14].

При изучении особенностей структуры и стабильности двуслойных пептидных комплексов с компоновкой разного типа, сложенных из параллельных или антипараллельных β -слоев пептидов $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$, нами был использован метод молекулярной динамики. Частично работа была начата ранее, и предварительные результаты использованы в настоящем исследовании в качестве важных примеров сравнения [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для данного исследования были созданы два типа пространственных структур филамента — двуслойного комплекса, состоящего из 24 пептидов $\text{H-(RADA)}_4\text{-OH}$ в β -конформации. В работе использовали пептидные комплексы с двумя β -слоями (L1 и L2) в *syn*- и *anti*-ориентациях, в том числе изучали конфигурации со смещенными относительно друг друга слоями.

Результаты молекулярной динамики позволяют говорить о том, что геометрия комплекса 24 антипараллельных пептидов DAN24 при 300 К консервативна, что определяется устойчивым положением атомов пептидных остовов в составе β -слоев, стабилизированных межмолекулярными водородными связями внутри каждого слоя (рис. 1, 2). Несколько более лабильны остатки А в положениях 14–4 у пар пептидов 1–2, остатки А в положениях 2–3 и 3–4 первого слоя L1, а также в

положениях 2–14 остатков А пары пептидов 11–12 второго слоя L2. Структура комплекса характеризуется неравномерным распределением по вертикали расстояний между пептидными парами в двух слоях комплекса.

Несколько сближены в вертикальной плоскости пептидные остовы у пар 1–2, 3–4, 5–6, 7–8, 9–10, 11–12, в результате структура комплекса протофиламента напоминает сборку из шести двуслойных тетрамеров антипараллельных пептидов (табл. 1, 2). Расстояния между C_β -атомами остатков А в 8-м положении пептидов комплекса DAN24 не изменяются существенным образом в ходе эксперимента, что указывает на стабильную конфигурацию структуры в целом (рис. 3).

Результаты определения расстояний между C_α -атомами остатков аланина в положениях 4 (рис. 4а) и в центральном положении 8 (рис. 4б) в β -слоях L1 и L2 пептидов комплекса 24 DAN24

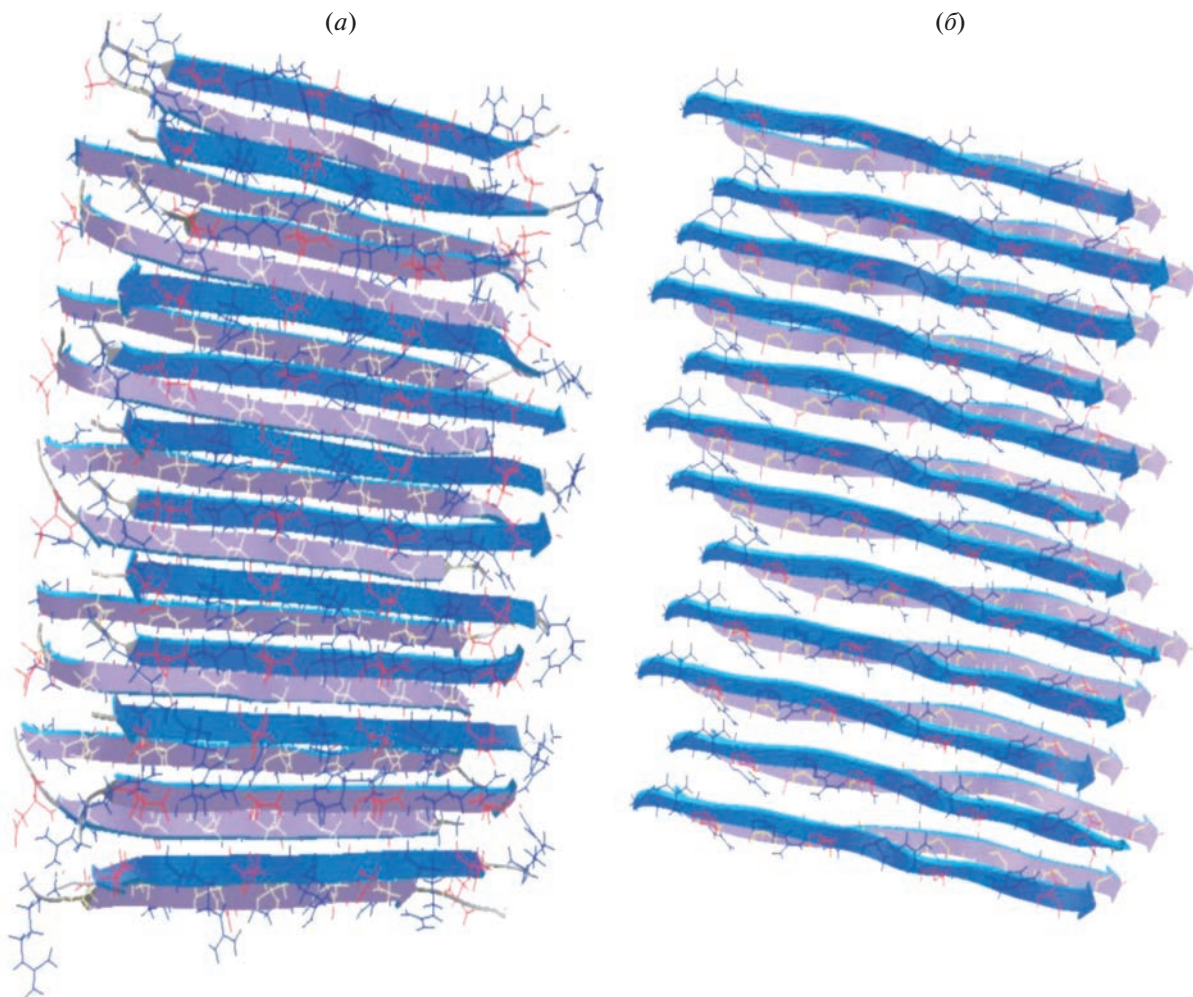


Рис. 1. Строение комплексов 24 пептидов $\text{H-(RADA)}_4\text{-OH}$: (а) — комплекс антипараллельных пептидов DAN24; (б) — комплекс параллельных пептидов с “выровненными” краями DSS24 в *syn*-ориентации. Стрелками обозначены направления от *N*- к *C*-концам пептидных остовов [15].

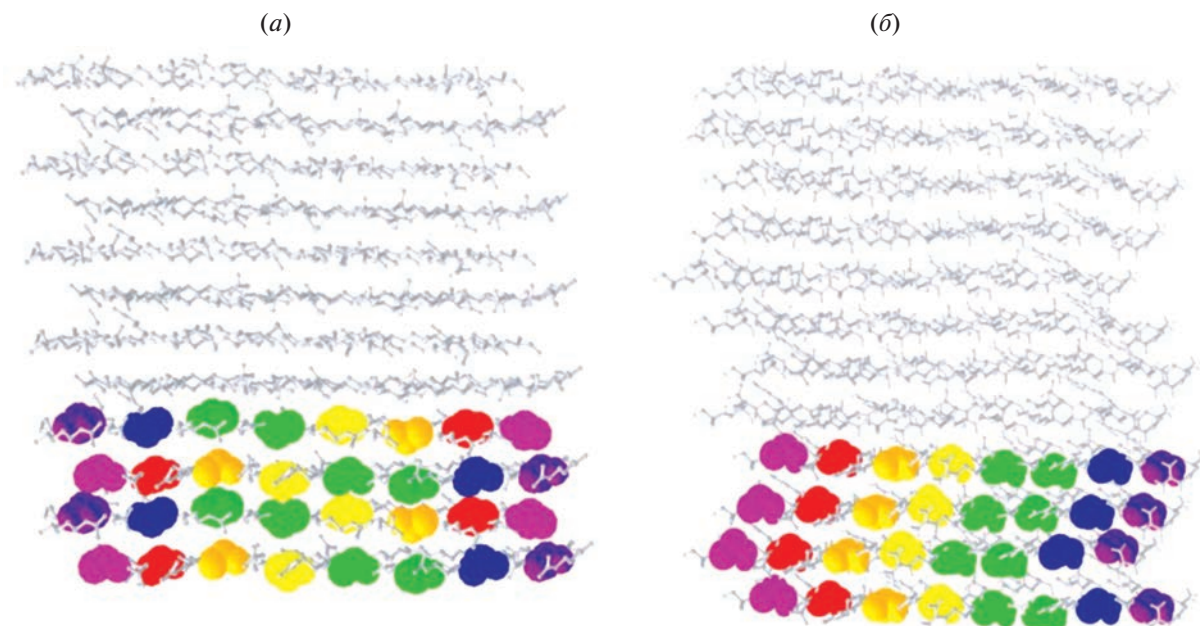


Рис. 2. Относительное расположение остатков А в двуслойных комплексах 24 пептидов. Остатки А в позициях 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 молекул пептидов H-(RADA)₄-OH на четырех из 12 уровней обозначены разными цветами: фиолетовым, синим, зеленым, желтым, оранжевым и красным соответственно. (а) – Двуслойный комплекс 24 антипараллельных пептидов DAN24; (б) – двуслойный комплекс 24 параллельных пептидов DSS24 в *syn*-ориентации. Для комплекса антипараллельных пептидов DAN24 попарные расстояния измеряли между атомами аминокислотных остатков А, расположенных в разных позициях в пептиде. Для комплекса DAN24 расстояния измеряли между атомами остатков, обозначенных идентичным цветом [15].

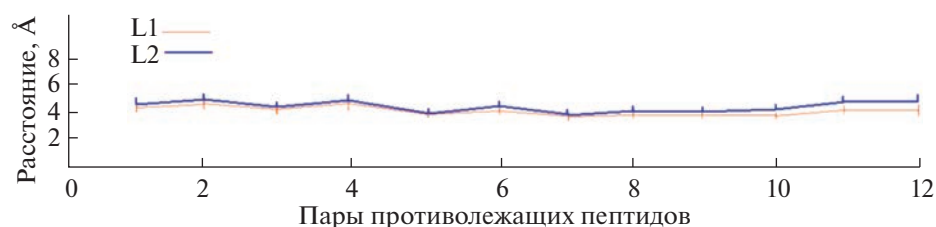


Рис. 3. Расстояние между C_β-атомами остатков А в положении 8 для пар пептидов в комплексе 24 антипараллельных пептидов DAN24 для β-слоев L1 и L2.

Таблица 1. Расстояния между C_α-атомами остатков А соседних пептидных остовов в комплексе 24 антипараллельных пептидов DAN24 (слой L1, 300 K) [15]

Пары пептидов	12–4	10–6	8–8	6–10	4–12	2–14
1–2	6.52 ± 0.2	6.49 ± 0.2	6.51 ± 0.2	6.50 ± 0.2	6.51 ± 0.2	6.56 ± 0.2
2–3	4.97 ± 0.2	4.87 ± 0.1	4.87 ± 0.1	4.89 ± 0.1	4.84 ± 0.1	5.45 ± 0.4
3–4	6.57 ± 0.2	6.55 ± 0.2	6.50 ± 0.1	6.54 ± 0.2	6.49 ± 0.2	5.64 ± 0.6
4–5	4.88 ± 0.2	4.87 ± 0.1	4.87 ± 0.1	4.87 ± 0.1	4.89 ± 0.1	4.95 ± 0.2
5–6	6.62 ± 0.2	6.52 ± 0.1	6.49 ± 0.1	6.52 ± 0.1	6.48 ± 0.1	6.54 ± 0.2
6–7	4.88 ± 0.2	4.90 ± 0.1	4.87 ± 0.1	4.86 ± 0.1	4.91 ± 0.1	4.86 ± 0.2
7–8	6.62 ± 0.2	6.53 ± 0.2	6.49 ± 0.1	6.53 ± 0.1	6.49 ± 0.1	6.51 ± 0.2
8–9	4.93 ± 0.2	4.90 ± 0.1	4.89 ± 0.1	4.86 ± 0.1	4.89 ± 0.1	4.86 ± 0.2
9–10	6.57 ± 0.2	6.53 ± 0.2	6.51 ± 0.1	6.51 ± 0.1	6.47 ± 0.1	6.50 ± 0.2
10–11	4.86 ± 0.2	4.83 ± 0.2	4.89 ± 0.1	4.91 ± 0.2	4.94 ± 0.2	4.95 ± 0.2
11–12	6.58 ± 0.2	6.60 ± 0.2	6.45 ± 0.2	6.56 ± 0.2	6.42 ± 0.2	6.38 ± 0.3

Примечание: приведены средние величины расстояний (Å) и дисперсии. Первая строка – позиции остатков А в соседних по вертикали пептидах, между которыми измеряется расстояние; первый столбец – пептидные молекулы в том слое, между остатками А которого определяется расстояние.

Таблица 2. Расстояния между C_{α} -атомами остатков А соседних пептидных остовов в комплексе 24 анти-параллельных пептидов DAN24 (слой L2, 300 К) [15]

Пары пептидов	12–4	10–6	8–8	6–10	4–12	2–14
1–2	4.61 ± 0.4	4.88 ± 0.4	4.37 ± 0.4	4.78 ± 0.4	4.26 ± 0.4	4.11 ± 0.4
2–3	5.14 ± 0.4	4.75 ± 0.4	5.24 ± 0.4	5.01 ± 0.4	5.45 ± 0.4	5.85 ± 0.5
3–4	4.23 ± 0.4	4.85 ± 0.4	4.34 ± 0.4	4.76 ± 0.4	4.19 ± 0.4	4.11 ± 0.4
4–5	5.25 ± 0.4	5.04 ± 0.4	5.23 ± 0.4	4.93 ± 0.4	5.35 ± 0.4	5.42 ± 0.5
5–6	4.13 ± 0.4	4.73 ± 0.4	4.35 ± 0.4	4.63 ± 0.4	4.34 ± 0.4	4.62 ± 0.5
6–7	5.49 ± 0.4	4.89 ± 0.3	5.16 ± 0.4	5.01 ± 0.4	5.28 ± 0.4	5.12 ± 0.5
7–8	4.66 ± 0.5	4.82 ± 0.4	4.42 ± 0.4	4.68 ± 0.4	4.35 ± 0.5	4.39 ± 0.5
8–9	5.33 ± 0.5	4.84 ± 0.3	5.28 ± 0.4	5.12 ± 0.4	5.40 ± 0.6	5.11 ± 0.5
9–10	4.30 ± 0.4	4.84 ± 0.4	4.34 ± 0.4	4.73 ± 0.5	4.30 ± 0.5	4.68 ± 0.6
10–11	5.33 ± 0.5	4.94 ± 0.4	5.35 ± 0.4	4.84 ± 0.3	4.94 ± 0.4	4.92 ± 0.5
11–12	4.17 ± 0.4	4.32 ± 0.4	4.13 ± 0.3	4.42 ± 0.5	4.20 ± 0.4	5.87 ± 2.0

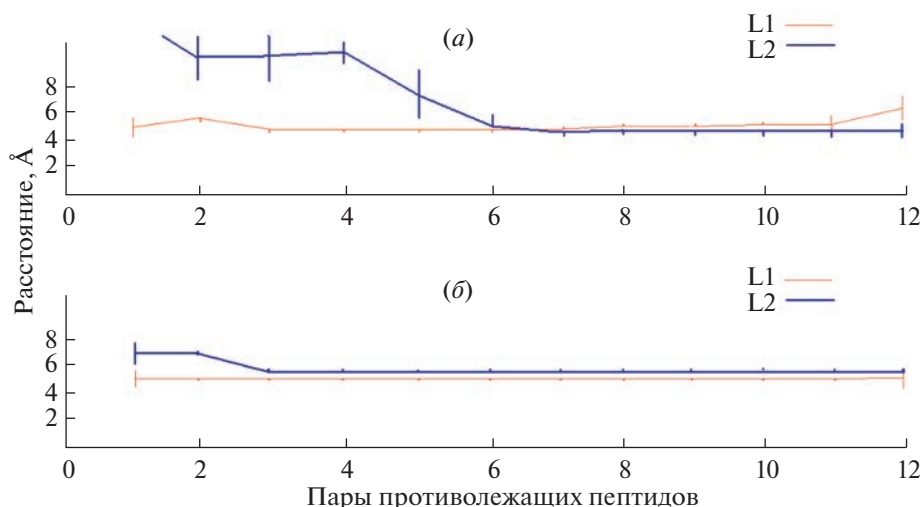
Примечание: приведены средние величины расстояний (Å) и дисперсии. Первая строка – позиции остатков А в соседних по вертикали пептидах, между которыми измеряется расстояние; первый столбец – пептидные молекулы в том слое, между остатками А которого определяли расстояние.

позволяют выявить тенденцию, отражающую большую степень отклонения координат групп атомов, расположенных вблизи торцевых поверхностей комплекса пептидов. Кроме того, изменение положений групп атомов отличается для каждого из рассмотренных слоев L1 и L2 комплекса DAN24.

Наименьшей устойчивостью β -конформации пептидных остовов в комплексе 24 параллельных пептидов DSS24 с β -слоями в *syn*-ориентации, которые условно выровнены относительно друг друга (рис. 1б), обладают пары пептидов, расположенные ближе к торцевой поверхности комплекса (рис. 5). Возможно, это объясняется эффектом одноименных зарядов в противолежащих слоях L1 и L2 пептидов, особенно на краях, где понижена стабилизирующая роль гидрофобных взаимодействий между слоями и водородных связей внутри β -слоев ввиду большей доступности мо-

лекул пептидов к взаимодействию с полярным окружением. Распределение расстояний между C_{β} -атомами остатков А в комплексе 24 параллельных пептидов DSS24 с выровненными слоями в *syn*-ориентации, в значительной мере повторяет ситуацию, определенную для C_{α} -атомов остатков аланина в пептидах, характеризующихся наибольшим изменением координат групп атомов аланиновых остатков, расположенных на флангах пептидов ($C4 > C8$), а также в пептидах, прилегающих к поперечным торцевым поверхностям двуслойного комплекса – пары пептидов 1, 2, 3, 12 (рис. 5).

Анализ углов Φ – Ψ аминокислотных остатков, сопряженных пептидной связью, позволяет охарактеризовать конформационные особенности начального и конечного состояний изучаемого объекта и сравнить стабильность исходной конфигурации комплексов [16]. На диаграмме

**Рис. 4.** Расстояние между C_{α} -атомами остатков А в положениях 4 (а) и 8 (б) для пар пептидов в комплексе 24 анти-параллельных пептидов DAN24 для β -слоев L1 и L2.

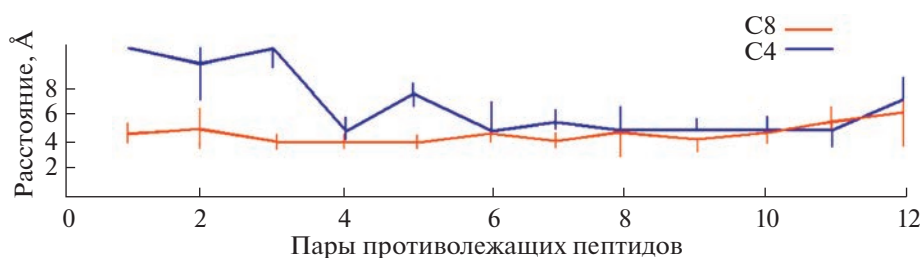


Рис. 5. Расстояние между C_β -атомами остатков А в положениях 4 и 8 для пар пептидов в комплексе 24 параллельных пептидов DSS24.

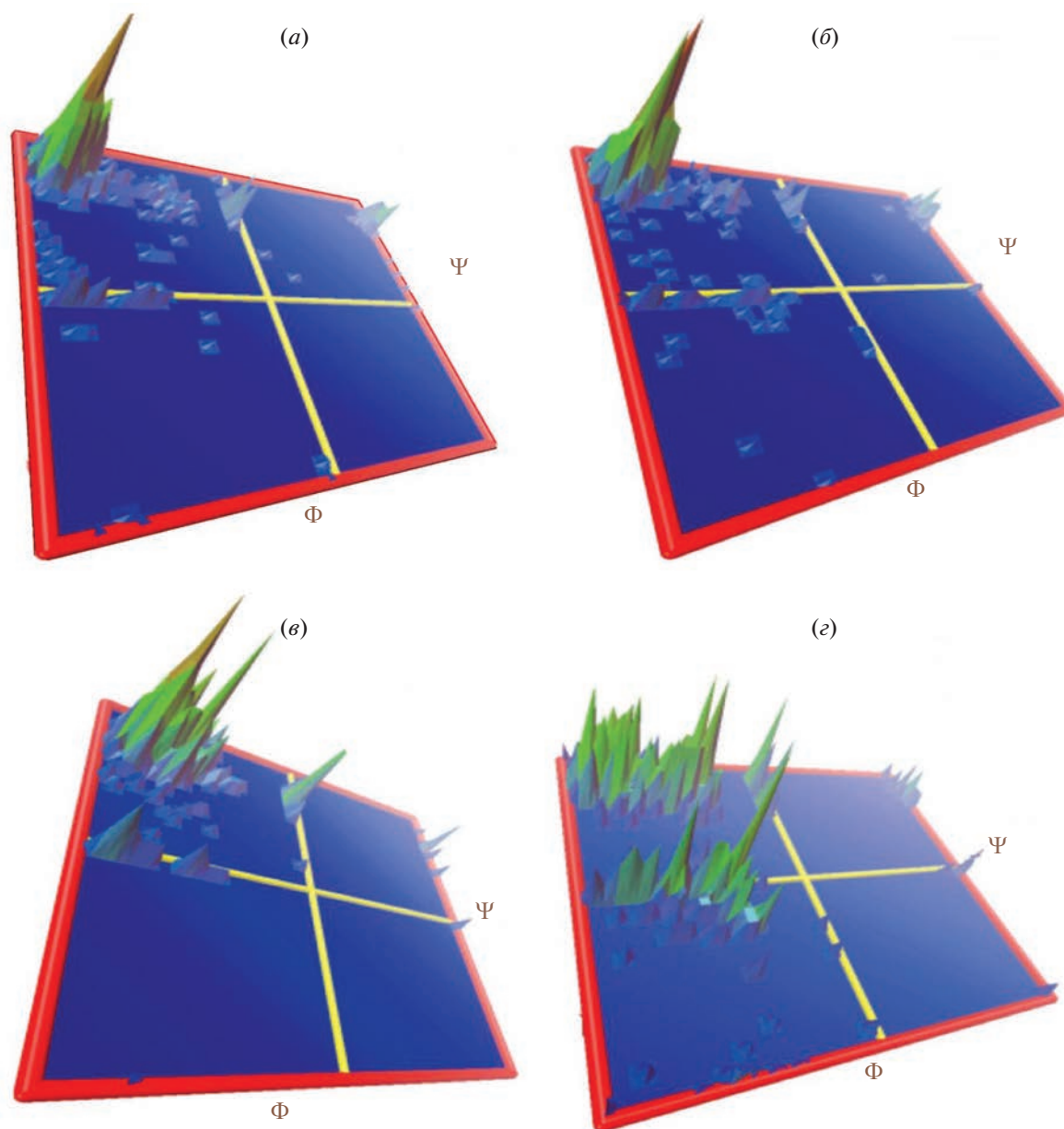


Рис. 6. Карты Рамачандрана для комплексов 24 пептидов $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$ в ходе эксперимента по молекулярной динамике: (а, б) – начальное и конечное состояния комплекса 24 антипараллельных пептидов DAN24; (г, з) – начальное и конечное состояния комплекса 24 параллельных пептидов DSS24 с “выровненными” слоями в *syn*-ориентации [15].

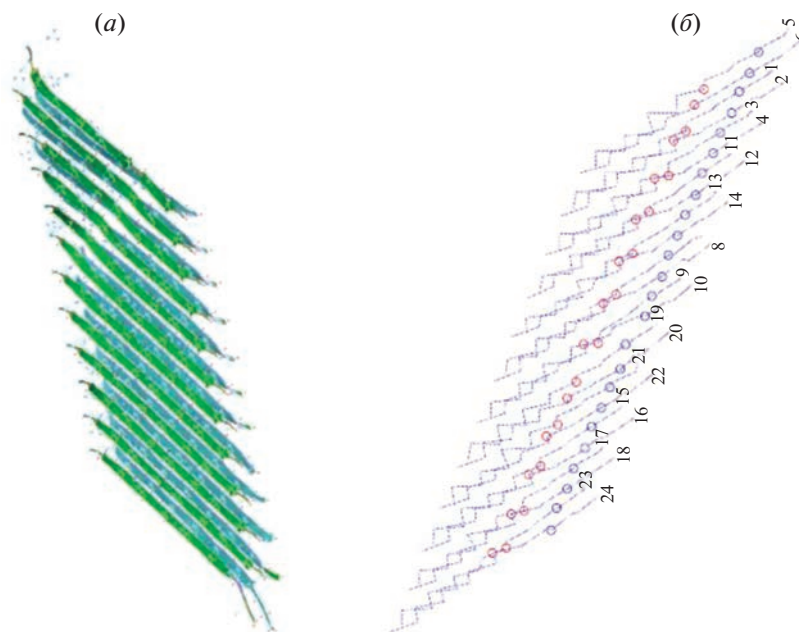


Рис. 7. (а) — Комплекс 24 параллельных пептидов NDSS24, смещенных в двух плоскостях относительно друг друга, с β -слоями в *syn*-ориентации; (б) — схема расположения атомов углерода остатков А в положениях 4 (выделено синим) и 8 (выделено красным) на остовах пептидов, остатки пронумерованы.

(рис. 6) отображены карты Рамачандрана структур двух видов комплексов в начальной и конечной точках молекулярной траектории. Величины пиков отражают количество аминокислотных остатков с указанными характеристиками пептидной связи. Рис. 6а и 6б характеризуют углы пептидных связей комплекса 24 антипараллельных пептидов H-(RADA)₄-OH (DAN24). В этом случае практически все значения анализируемых углов Φ — Ψ в начальной (рис. 6а) и конечной (рис. 6б) фазах траектории молекулярной динамики локализованы в левом верхнем квадранте, что соответствует β -конформации пептидной структуры. Данный факт также указывает на стабильность структуры комплекса антипараллельных пептидов DAN24 в условиях эксперимента. Результаты, полученные при изучении изменения углов пептидной связи в комплексе 24 параллельных молекул H-(RADA)₄-OH комплекса DSS24 с “выровненными” слоями в *syn*-ориентации показывают, что значительное количество пептидов в ходе эксперимента при 300 К изменяет начальную β -конформацию (рис. 6б, 6г). Данное обстоятельство позволяет охарактеризовать структуру комплекса DSS24 как менее стабильную по сравнению с комплексом пептидов в антипараллельной ориентации DAN24, в котором за время эксперимента исходную β -конформацию сохраняет большинство пептидов. Этот вывод подтверждается вычисленными величинами среднеквадратичного отклонения координат атомов анализируемых комплексов, наблюдаемых в ходе эксперимента.

Для проверки влияния одноименных зарядов на стабильность комплекса 24 параллельных пептидов мы создали и охарактеризовали альтернативный вариант структуры комплекса NDSS24, в которой не только соседние параллельные пептиды в каждом слое, но и сами слои в *syn*-ориентации смещены относительно друг друга (рис. 7). Чередование заряженных и нейтральных боковых заместителей в составе молекулы H-(RADA)₄-OH позволяет использовать смещение взаимного положения остовов параллельных пептидов с целью минимизации отталкивания одноименных зарядов. На рис. 8 приведены диаграммы расстояний между C_β -атомами остатков аланина в положениях 4 и 8, полученные при 80 и 300 К. Видно, что центральные области пептидов, составляющих филамент, более “раздвинуты” (6.5–7.0 Å) по сравнению с фланговыми областями (C_4), где расстояние между слоями составляет 4.2–5.0 Å, кроме пар пептидов 1 и 12, приближенных к торцевым поверхностям комплекса филамента. Данная тенденция сохраняется для двух значений температуры и может подразумевать возможность более сложной динамики комплекса, способной повлиять на структуру или форму филамента.

Величины среднеквадратичного отклонения координат центров масс атомов, вычисленные по результатам эксперимента, указывают на то, что комплекс DAN24, сформированный антипараллельными пептидами H-(RADA)₄-OH, конформационно наиболее стабилен.

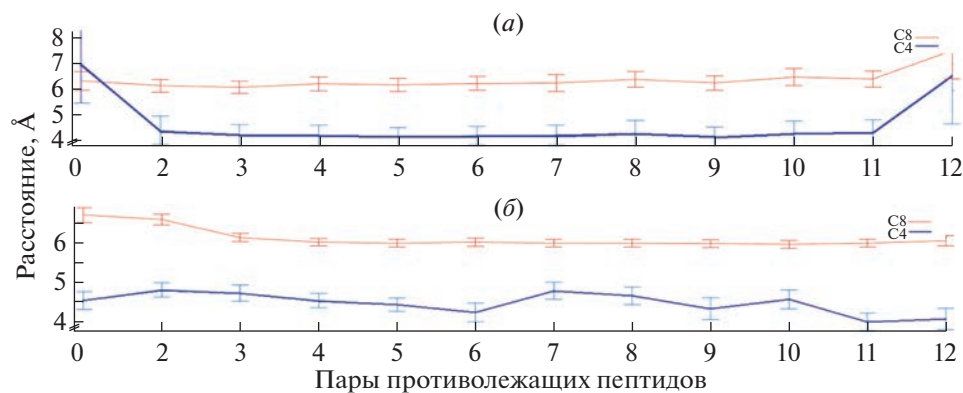


Рис. 8. Расстояние между C_β-атомами остатков А в положениях 4 и 8 для пар пептидов в комплексе 24 параллельных пептидов NDSS24 при 80 К (а) и 300 К (б).

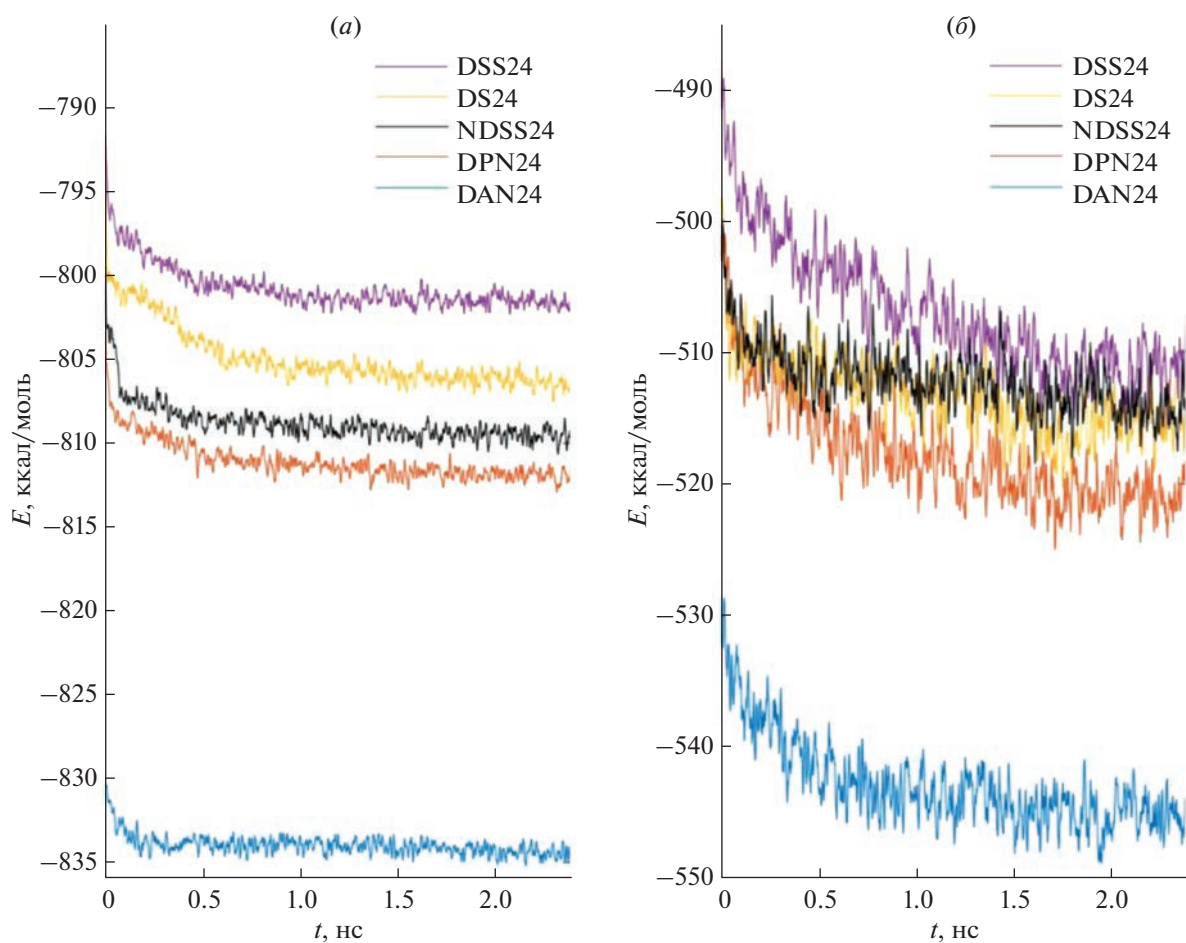


Рис. 9. Изменение внутренней энергии E различных комплексов 24 пептидов H-(RADA)₄-OH в ходе эксперимента по молекулярной динамике при 80 К (а) и 300 К (б). Приведены средние величины E в пересчете на один пептид.

Дополнительная характеристика, которая может быть использована для сравнения комплексов пептидов, — это величина свободной энергии:

$E = E_{MM} + E_{solv}$, которая складывается из молекулярно-механической энергии атомов и энергии сольватации, отражающей потенциал поверх-

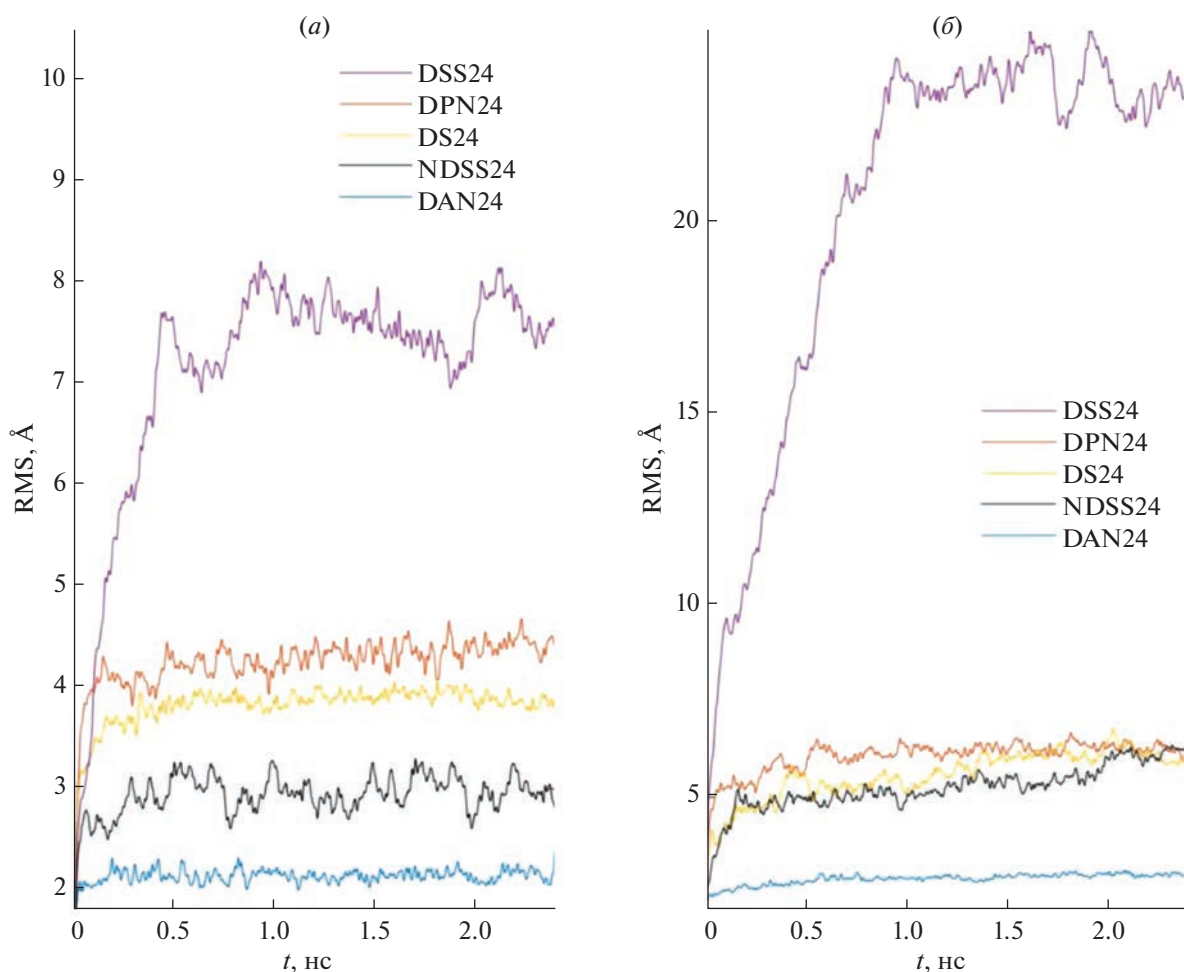


Рис. 10. Отклонение координат атомов (RMS) для различных комплексов 24 пептидов H-(RADA)₄-ОН в ходе эксперимента по молекулярной динамике при 80 К (а) и 300 К (б). Приведены средние величины отклонения координат атомов от исходного положения в пересчете на один пептид.

ностных взаимодействий с полярным окружением. На рис. 9 приведены графики изменения свободных энергий комплексов, состоящих из 24 антипараллельных пептидов H-(RADA)₄-ОН, и нескольких вариантов комплексов 24 параллельных пептидов со слоями в *sup*-ориентации.

Результаты молекулярной динамики показали, что наиболее компактной и стабильной структурой обладает комплекс DAN24, сформированный 24 антипараллельными пептидами H-(RADA)₄-ОН в *anti*-ориентированных β-слоях. Структура комплекса NDSS24 из 24 параллельных пептидов, смещенных относительно друг друга в двух плоскостях, оказалась устойчивой и более стабильной, чем структура комплекса 24 параллельных пептидов DSS24 с “выровненными” краями, который частично описан ранее [15].

Наибольшее изменение начальной конформации пептидных остовов при 300 К отмечено в областях, прилегающих к торцевым поверхностям

лентовидного филамента, где срединный гидрофобный слой, сформированный боковыми заместителями остатков аланина, непосредственно контактирует с полярным окружением. По мере удаления от горизонтальных торцевых “срезов” комплекса протофиламента (пары пептидов 1, 2, 11, 12) расстояния между соседними остовами пептидов и отклонения координат групп атомов от начального положения (RMS) уменьшаются, что указывает на снижение степени деформации их начальной геометрии (рис. 10).

Ранее мы сообщали о некоторых особенностях структуры тетрамеров антипараллельных полярных самоорганизующихся пептидов [16]. Все наши предыдущие данные были также получены с использованием программы Amber11 [17]. Было показано, что тетрамеры антипараллельных пептидов могут выступать в качестве минимальной структуры, достаточной для сборки протяженного филамента. Данное предположение подтверждается способностью продуктов ультра-

звуковой дезинтеграции протяженного филамента из пептидов H-(RADA)₄-OH сохранять характеристические признаки протофиламентов, способных участвовать в восстановлении протяженного филамента после возвращения в нормальные условия [18]. В общем случае изменение геометрии протофиламента, сложенного из антипараллельных пептидов в β-конформации (DAN24), как показано на рис. 10, оказывается существенно меньшим по сравнению с комплексом параллельных пептидов в составе двух β-слоев в *sup*-ориентации (DSS24 и NDSS24). В частности, для комплексов параллельных пептидов H-(RADA)₄-OH с выровненными краями слоев (DSS24) отмечена существенно большая девиация координат аминокислотных остатков А, расположенных на флангах пептидов, чем в комплексе NDSS24, в котором остовы соседних пептидов и противолежащие слои смещены относительно друг друга с целью минимизации взаимного отталкивания равных зарядов в соседних пептидах. Эти особенности компоновки структуры существенно повлияли на термодинамику комплекса NDSS24 и его стабильность.

Можно видеть (рис. 9), что абсолютные величины свободных энергий для комплексов антипараллельных (DAN24) и параллельных пептидов (DSS24, NDSS24) различаются, при этом более низкая величина энергии характеризует комплекс антипараллельных пептидов DAN24. В пользу большей стабильности данной структуры говорит то, что в ходе эксперимента по молекулярной динамике величина свободной энергии комплексов 24 пептидов понижается, достигая локального минимума к отметке 1.5 нс, сохраняясь далее на этом уровне до конца эксперимента. Величина свободной энергии комплекса 24 антипараллельных пептидов составила –833 и –545 ккал/моль при 80 и 300 К соответственно. Для комплекса 24 параллельных пептидов DPN24 со слоями в *anti*-ориентации величина свободной энергии составила –812 и –520 ккал/моль при 80 и 300 К соответственно. Для комплексов 24 параллельных пептидов со слоями в *sup*-ориентации DS24 и DSS24 величины свободной энергии составили –806 и –801 ккал/моль при 80 К и –514 и –508 ккал/моль при 300 К соответственно [15]. Термодинамические характеристики комплекса 24 параллельных пептидов NDSS24 со слоями в *sup*-ориентации приближаются к показателям комплекса антипараллельных пептидов, составляя –808 и –514 ккал/моль при 80 и 300 К соответственно (рис. 9), хотя в ходе эксперимента по молекулярной динамике величина энергии не достигает значений, характерных для комплекса антипараллельных пептидов DAN24. Таким образом, несмотря на то что комплексы параллельных пептидов DS24 и DSS24 характеризуются большими величинами свободной энергии по сравнению с комплексом антипараллельных пептидов DAN24,

данный факт не исключает возможность образования стабильных структур параллельными пептидами, что подтверждается относительной стабильностью комплексов параллельных пептидов H-(RADA)₄-OH типа DPN24 [15] или NDSS24. Данные системы термодинамически устойчивы благодаря особенностям взаимного расположения пептидов в слоях и самих слоев в составе комплекса [19].

Полученный результат позволяет не только соотнести геометрии исследуемых структур, но также сравнить их с другими моделями, разработанными с учетом экспериментальных данных, полученных физико-химическими методами, в том числе ЯМР [20]. Чувствительность физико-химических методов не позволяет пока обеспечить разрешение, достаточное для детального рассмотрения внутреннего строения пептидного комплекса, а опубликованные выводы относительно взаимной ориентации пептидных остовов в составе двуслойного комплекса, состоящего из β-слоев, противоречивы [21]. Именно по этой причине мы использовали метод молекулярной динамики для оценки характеристик возможной структуры протофиламента.

Результаты, полученные в данной работе, указывают на то, что антипараллельная укладка пептидных остовов в составе комплекса обеспечивает не только минимальную свободную энергию структуры (рис. 9), но и наименьшую среднеквадратичную величину отклонения координат атомов (RMS, Å) от начальной позиции при 300 К (рис. 10).

По результатам работы можно сделать вывод, что наиболее стабильна структура двуслойного комплекса, сложенная из 24 антипараллельных пептидов (12 пар) DAN24. В то же время кроме бислойной структуры комплекса 24 параллельных пептидов DPN24 с β-слоями в *anti*-ориентации, предложенной ранее [15], также стабильной оказалась новая структура – комплекс 24 параллельных пептидов NDSS24 с двумя β-слоями в *sup*-ориентации, где пептиды в слоях смещены относительно друг друга, и сами слои смещены относительно друг друга с целью уменьшить взаимное отталкивание одноименных зарядов групп атомов в пептидах противоположных слоев комплекса. Примечательно, что при 300 К “конформационная подвижность” комплексов DPN24 и NDSS24 характеризуется близкими величинами RMS ~5 Å, что указывает на близкую эффективность способов минимизации взаимного отталкивания равных зарядов противолежащих слоев, реализованных в настоящем исследовании. Очевидно, что данный факт необходимо учитывать при рассмотрении всех особенностей начальных этапов процесса образования

филамента в ходе самоорганизации молекул пептида H-(RADA)₄-ОН.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пространственные модели филамента. Для данного исследования были созданы два прототипа структуры филамента: в виде двуслойного комплекса пептидов H-(RADA)₄-ОН в β -конформации, состоящего из 24 параллельных пептидов с двумя β -слоями в *syn*-ориентации, а также 24 антипараллельных пептидов из двух β -слоев в *anti*-ориентации. Во всех случаях боковые гидрофобные заместители аланинов находились внутри двуслойного филамента, формируя своеобразную гидрофобную “начинку”. Процесс моделирования происходил поступательно с использованием пакета программ HyperChem8 [22], начиная с конструирования единичной структуры пептида H-(RADA)₄-ОН в β -конформации и сохранением данных о координатах атомов модели в PDB-файле. Созданную модель пептида последовательно использовали для молекулярного докинга, реализованного на основе программного пакета HEX v6.1 [23] без учета кулоновских взаимодействий, сначала для получения комплексов пар молекул, затем тетрамеров и в последующем — комплексов более высокого порядка с соответствующей взаимной ориентацией пептидных остовов. Процедуру молекулярного докинга повторяли с использованием альтернативного программного продукта GRAMM-X [24] с учетом геометрии контактирующих субстратов, но без учета кулоновских взаимодействий. Результаты молекулярного докинга, полученные с использованием двух альтернативных программ, оказались практически идентичными. Построенные модельные структуры с минимальной энергией использовали в качестве исходных объектов исследования в дальнейших экспериментах в виде PDB-файлов координат атомов соответствующих комплексов.

Подготовка проб. Состояние протонирования заряженных аминокислотных остатков было выбрано соответствующим рН 7.0. Модельные структуры пептидов минимизировали по энергиям, осуществляя три последовательные серии оптимизации с учетом кулоновских взаимодействий. Каждая серия состояла из 500 циклов, с промежуточным “встряхиванием” атомов структуры перед началом следующей процедуры с целью уменьшения вероятности останова процесса оптимизации в локальном энергетическом минимуме. Минимизацию энергии продолжали до момента “отсечки”, при котором разность ΔE величин энергий двух последовательных серий в ходе минимизации энергии становилась менее выбранного “порогового” значения -1.0 кДж/моль, при использовании параметрического силового поля GROMOS96-43B, реализованного в программе

Swiss-PdbViewer v.4.1.0 [25]. Файлы координат атомов, соответствующие полученным моделям, в формате PDB использовали в качестве исходных данных о начальном состоянии объекта при проведении экспериментов по молекулярной динамике.

Молекулярная динамика. Моделирование молекулярной динамики комплекса белков и лиганда, а также последующий анализ результатов осуществляли с использованием пакета программ Amber11 [17]. Моделирование динамики комплексов проводили без учета явного водного окружения в силовом поле AMBER ff03 [26] при 300 К. В результате исполнения протокола, аналогичного использованному ранее, были рассчитаны молекулярные траектории для экспериментальных структур и комплексов 24 пептидов [27]. В каждом случае сначала энергию системы минимизировали при фиксированном положении координат атомов полипептидов, чтобы упорядочить атомарные взаимодействия, затем молекулярную систему разогревали до выбранной температуры и вычисляли молекулярно-динамическую траекторию атомов исследуемой структуры длительностью не менее 2.4 нс с помощью управляющего файла [15].

Полученные молекулярные траектории визуализировали с использованием программы VMD v1.9.1 [28]. Свободную энергию комплексов вычисляли с использованием обобщенного метода Борна, точность которого оказалась приемлемой, с учетом условий моделирования динамики молекул и относительно стабильной конформации структур, изучаемых в эксперименте [29]. Расстояния между атомами аминокислот пептидов вычисляли с использованием пакета программ CPPTRAJ, который выступает частью пакета AMBER v11. Геометрию пептидных остовов (вторичную структуру) классифицировали согласно общепринятому способу Kabsch и Sander [30]. Соответствующие расчеты проводили на кластере K-60 Института прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе, используя метод молекулярной динамики, сравнили пять видов комплексов 24 пептидов H-(RADA)₄-ОН, в том числе впервые был охарактеризован вид комплекса параллельных пептидов NDSS24. Результаты показали, что наиболее стабильными оказались структуры DAN24 (из антипараллельных пептидов) и NDSS24 (из параллельных пептидов со смещенными слоями в *syn*-ориентации). Структуры DAN24 и NDSS24 обладают более низкой свободной энергией и характеризуются меньшим смещением атомов от начальных координат по сравнению с комплексом DSS24 (из параллельных пептидов с “выровненными” краями слоев в *syn*-

ориентации). Метильные группы боковых заместителей остатков А в комплексе DAN24 характеризуются равномерным распределением центров масс атомов углерода метильных групп остатков А, расположенных в центральном гидрофобном слое. При этом атомы углерода метильных групп характеризуются большей вариабельностью расстояний между атомами остатков А противоположащих слоев на краях филамента. Это указывает на более высокую лабильность групп атомов гидрофобного слоя по сравнению с C_α-атомами пептидных остовов. Вероятно, центральный гидрофобный слой филамента обладает сравнительно высокой пластичностью, что способствует сохранению целостности всей структуры, обеспечивая компенсацию напряжений, вызываемых смещением групп атомов внешних слоев комплекса вследствие термического или химического воздействия.

Полученные результаты дают большее понимание возможных способов самоорганизации пептидов в растворе, а также облегчают рациональный подход к конструированию модифицированных молекул самоорганизующихся пептидов для одновременной реализации двух свойств — образования филамента и изменения функциональных свойств поверхностей филамента (тропизма) в отношении лекарственных веществ или клеток определенного типа путем экспонирования добавленных модификаторов в окружающую среду. Работы в данном направлении обеспечат получение результатов, позволяющих использовать самоорганизующиеся пептиды не только в качестве лекарственного “депо”, но и как искусственный матрикс для широкого применения в регенеративной медицине.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность академику РАН В.Т. Иванову за интерес, проявленный к теме изучения самоорганизующихся структур, а также всеобъемлющее и глубокое обсуждение промежуточных результатов работы, ставшее мощным побудительным мотивом к развитию направления по изучению молекулярной динамики самоорганизующихся пептидов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках программы “Неклинические исследования биомедицинских технологий и биофармацевтических продуктов” (№ ЕГИСУ (гос. регистрации) АААА-А19-119021590083-3, код темы FMFM-2019-0036), а также частично 075-00381-21-00 и 0017-2019-0009.

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. Ovchinnikov Yu.A., Ivanov V.T. // In: The Proteins. 3rd edition / Eds. Neurath H., Hill R.L. New York: Acad. Press, 1982. V. 5. P. 307–642.
[https://doi.org/10.1016/0161-5890\(84\)90081-6](https://doi.org/10.1016/0161-5890(84)90081-6)
2. Collier J.H., Rudra J.S., Gasiorowski J.Z., Jung J.P. // Chem. Soc. Rev. 2010. V. 39. P. 3413–3424.
<https://doi.org/10.1039/b914337h>
3. Seyedkarimi M.S., Mirzadeh H., Bagheri-Khoulenjani S. // J. Biomed. Mat. Res. Part A. 2019. V. 107. P. 330–338.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36495>
4. Zhang S.G., Holmes T.C., Diersio C.M., Hynes R.O., Su X., Rich A. // Biomaterials. 1995. V. 16. P. 1385–1393.
[https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)96874-y](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)96874-y)
5. Kumada Y., Zhang S. // PLoS One. 2010. V. 5. P. e10305.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010305>
6. Naotaro Akiyama N., Yamamoto-Fukuda T., Takahashi H., Koji T. // Int. J. Nanomed. 2013. V. 8. P. 2629–2640.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S47279>
7. Zhang S.G., Lockshin C., Herbert A., Winter E., Rich A. // EMBO J. 1992. V. 11. P. 3787–3796.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05464.x>
8. Данилкович А.В., Липкин В.М., Удовиченко И.П. // Биоорг. химия. 2011. Т. 37. С. 780–785. [Danilkovich A.V., Lipkin V.M., Udovichenko, I.P. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2011. V. 37. P. 707–712.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162011060069>
9. Pauling L., Corey R.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1951. V. 37. P. 251–256.
<https://doi.org/10.1073/pnas.37.5.251>
10. Zhang S., Holmes T., Lockshin C., Rich A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 3334–3338.
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3334>
11. Zarei H., Aramvash A., Seyedkarimi M.S. // Int. J. Peptide Res. Therapeutics. 2019. V. 25. P. 265–272.
<https://doi.org/10.1007/s10989-017-9669-2>
12. Altman M., Lee P., Rich A., Zhang S.G. // Protein Sci. 2000. V. 9. P. 1095–1105.
<https://doi.org/10.1110/ps.9.6.1095>
13. Marcotte E.M., Pellegrini M., Yeates T.O., Eisenberg D.A. // J. Mol. Biol. 1999. V. 293. P. 151–160.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3136>
14. Chen Y.W., Ding F., Nie H.F., Serohijos A.W., Sharma S., Wilcox K.C., Yin Y.S., Dokholyan N.V. // Arch. Biochem. Biophys. 2008. V. 469. P. 4–19.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.05.014>
15. Данилкович А.В., Тихонов Д.А. // Препринты ИПМ им. М.В.Келдыша. 2019. № 72. 24 с.
<https://doi.org/10.20948/prepr-2019-72>

16. Danilkovich A.V., Sobolev E.V., Tikhonov D.A., Udovichenko I.P., Lipkin V.M. // Dokl. Biochem. Biophys. 2012. V. 443. P. 96–99.
<https://doi.org/10.1134/S160767291202010X>
17. Simmerling C., Wang B., Woods R.J. // J. Computation. Chem. 2005. V. 26. P. 1668–1688.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20290>
18. Yokoi H., Kinoshita T., Zhang S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 8414–8419.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0407843102>
19. Zhang S., Lockshin C., Cook R., Rich A. // Biopolymers. 1994. V. 34. P. 663–672.
<https://doi.org/10.1002/bip.360340508>
20. Cormier A.R., Pang X., Zimmerman M.I., Zhou H.-X., Paravastu A.K. // ACS Nano. 2013. V. 7. P. 7562–7572.
<https://doi.org/10.1021/nn401562f>
21. Huang D., Zimmerman M.I., Martin P.K., Nix A.J., Rosenberry T.L., Paravastu A.K. // J. Mol. Biol. 2015. V. 427. P. 2319–2328.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.04.004>
22. HyperChem® Computational Chemistry. Practical Guide – Theory and Method, HC 70-00-04-00. Gainesville: Hypercube Inc., 2002. 350 p.
23. Macindoe G., Mavridis L., Venkatraman V., Devignes M.-D., Ritchie D.W. // Nucleic Acids Res. 2010. V. 38. P. 445–449.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq311>
24. Tovchigrechko A., Vakser I. // Proteins. 2005. V. 60. P. 296–301.
<https://doi.org/10.1002/prot.20573>
25. VanGunsteren W.F., Billeter S.R., Eising A.A., Hunenberger P.H., Kruger P., Mark A.E., Scott W.R.P., Tironi I.G. // Biomol. Simulation. Zurich: Vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zurich, 1996. P. 1042.
26. Duan Y., Wu C., Chowdhury S., Lee M.C., Xiong G., Zhang W., Yang R., Cieplak P., Luo R., Lee T., Caldwell J., Wang J., Kollman P. // J. Computation. Chem. 2003. V. 24. P. 1999–2012.
<https://doi.org/10.1002/jcc.10349>
27. Danilkovich A.V., Sobolev E.V., Tikhonov D.A., Shadrina T.E., Udovichenko I.P. // Math. Biol. Bioinform. 2011. V. 6. P. 92–101.
<https://doi.org/10.17537/2011.6.92>
28. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // J. Mol. Graphics. 1996. V. 14. P. 33–38.
[https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
29. Onufriev A., Bashford D., Case D. // J. Phys. Chem. Part B. 2000. V. 104. P. 3712–3720.
<https://doi.org/10.1021/jp994072s>
30. Kabsch W., Sander C. // Biopolymers. 1983. V. 12. P. 2577–2637.
<https://doi.org/10.1002/bip.360221211>

Dynamics of 24 Self-Assembling H-(RADA)₄-OH Peptides Complexed in Bi-Layered Structure with Layers in *syn* and *anti* Orientation

A. V. Danilkovich*, #, D. A. Tikhonov**, ***, and V. M. Lipkin*

*Phone: +7 (496) 773-08-93; e-mail: danilkovich@bibch.ru

*Branch of Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS,
prosp. Nauki 6, Pushchino, 142290 Russia

**Institute of Mathematical Problems of Biology – the Branch of Keldysh Institute of Applied Mathematics,
Russian Academy of Sciences, ul. Vitkevicha 1, Pushchino, 142290 Russia

***Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, 142290 Russia

H-(RADA)₄-OH peptide in water tends to form biogels at physiological conditions. Thusly made scaffold is formed of fibrils resulted from peptides self-assembling. Fibrils have two external hydrophilic layers, while hydrophobic one is situated between of them. Bio gels by the H-(RADA)₄-OH peptides are considered to be a prominent source for designed extra cellular matrix aimed to cell cultures of different types. Little is known about detailed structure the filament structure and β -sheets peptide composition. We have designed and studied molecular dynamics of bi-layered protofilament structures with β -sheets formed of parallel or anti-parallel peptide chains. Method of molecular dynamics was used to study H-(RADA)₄-OH peptide complexes at 80 and 300 K. While the most stable peptide complex was found to consist of anti-parallel peptides, had the lowest free energy and the least deviation of atom coordinates, yet another stable structure of the peptide complex was identified as 24-mer of parallel peptides with two β -sheets placed in *syn* orientation. These results underlined the importance of factors, directing the initial stages of the H-(RADA)₄-OH peptide self-assembling in solution.

Keywords: self-assembly, scaffold, filament structure, polar peptides, H-(RADA)₄-OH



РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ БИОСИНТЕЗА, ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ХОЛОФОРМЫ РЕКОМБИНАНТНОГО НЕЙРОГЛОБИНА И ЕГО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА¹

© 2023 г. М. А. Семенова*, Ж. В. Бочкова*, **, О. М. Смирнова*, А. А. Игнатова*,
Е. Ю. Паршина**, Р. Х. Зиганшин*, Э. В. Бочаров*, Н. А. Браже**, Г. В. Максимов**,
М. П. Кирпичников*, ***, Д. А. Долгих*, ***, Р. В. Чертова*.*

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

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики,
Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1/12

***Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1/12

Поступила в редакцию 29.11.2022 г.

После доработки 21.12.2022 г.

Принята к публикации 22.12.2022 г.

Разработана и оптимизирована эффективная система биосинтеза, выделения и очистки рекомбинантного нейроглобина человека, позволяющая наработать белок в количествах, достаточных для исследования его свойств. Согласно данным УФ-видимой, ИК-, КД- и ЯМР-спектроскопии, рекомбинантный нейроглобин представляет собой структурированную холоформу белка. Данные хромато-масс-спектрометрического анализа позволили сделать вывод о наличии в структуре окисленной формы белка правильно замкнутой дисульфидной связи. При помощи спектроскопии комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния с лазерным возбуждением 532 нм показано, что гем в восстановленной и окисленной формах нейроглобина имеет колебательные степени свободы, типичные для гемов *b*-типа, а атом железа гексакоординирован. С использованием спектроскопии комбинационного рассеяния с лазерным возбуждением 633 нм выявлено, что в восстановленном нейроглобине присутствуют восстановленные –SH-группы, которые образуют дисульфидный мостик в окисленном нейроглобине. Полученные результаты служат основой для детальных исследований механизма функционирования нейроглобина в качестве нейропротектора, в частности при его взаимодействии с окисленным цитохромом *c*, транслоцирующимся из митохондрий в цитозоль при нарушениях их функционирования и/или морфологии.

Ключевые слова: нейроглобин, рекомбинантные белки, гемсодержащие белки, глобины

DOI: 10.31857/S013234232303020X, **EDN:** PEAUKB

ВВЕДЕНИЕ

Гемсодержащий белок нейроглобин (Ngb) из семейства глобинов, ближайший структурный аналог миоглобина (Mb), обнаружен в нейронах центральной и периферической нервной системы млекопитающих около двадцати лет назад [1]. В тканях общая концентрация нейроглобина существенно ниже, чем миоглобина, однако может достигать значительно более высоких concentra-

ций в нейронах гипоталамуса [2] и в стержневых клетках сетчатки (до ~100 мкМ) [3]. Нейроглобин представляет собой мономерный белок из 151 а.о., массой ~17 кДа, состоящий из восьми α -спиралей (A–H), с известной пространственной структурой и внутримолекулярной дисульфидной связью (Cys46–Cys55) [1, 4]. Полипептидная цепь Ngb связана координационными связями с кофактором – гемопорфирином IX. Основная характерная особенность, отличающая Ngb от гемоглобина и Mb, – преимущественно гексакоординированная форма (в отсутствие внешних лигандов), хотя известна форма с пятью координационными связями между гемопорфирином и полипептидной цепью, придающая белку типичную глобиновую реактивность [5]. Аминокислотные последовательности Ngb позвоночных отличаются высокой межвидовой консервативностью и схожи с нейроглобинами

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: САА – хлорацетамид; Сyt *c* – митохондриальный цитохром *c*; Mb – миоглобин; Ngb – нейроглобин; ТCЕР – трис(2-карбоксиэтил)фосфин; ГKP – гигантское комбинационное рассеяние; КД – круговой дихроизм; КР – комбинационное рассеяние.

Автор для связи: (тел.: +7 (903) 772-86-54; эл. почта: cherita@inbox.ru).

беспозвоночных [6], что свидетельствует о специфической и важной роли этого глобина в нервной системе животных *in vivo*. Подобно гемоглобину и миоглобину, Ngb обратимо связывает O_2 и другие газообразные лиганды. Дезоксиформа восстановленного Ngb мыши превращает нитрит в NO со скоростью, аналогичной скорости Mb [7], но Ngb человека, по-видимому, медленнее катализирует эту реакцию [8]. Физиологическую роль Ngb подробно исследовали в ранних работах, и было обнаружено, что в нейронах головного мозга этот белок играет нейропротекторную роль, снижает количество апоптотических клеток, т.е. проявляет свойства антиапоптотического фактора [9–11].

Таким образом, Ngb обладает существенным потенциалом практического применения в качестве основы для рационального дизайна биомедицинских препаратов с улучшенными антиапоптотическими свойствами, действие которых направлено на ингибирование гибели нейрональных клеток. Подобные препараты могут быть чрезвычайно востребованы в качестве терапевтических средств как при патологических состояниях (нейродегенеративных заболеваниях, инсультах, ишемиях и гипоксиях различного генеза), так и для замедления физиологического старения. Препараты на основе Ngb могут найти применение в терапии дегенеративных заболеваний глаз, таких как глаукома, а также при различных травмах, связанных с нарушением целостности нервных тканей. Кроме того, исследования Ngb могут открыть новые перспективы и в других активно развивающихся областях применения гемосодержащих и электронтранспортных белков, например, в биомолекулярной электронике, а также для создания различных детекторов и сенсорных систем.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе нейропротекторной функции Ngb, выступают предметом больших споров [12, 13] и остаются малоизученными по сей день. Одна из гипотез механизмов антиапоптотической функции нейроглобина базируется на взаимодействии Ngb с цитохромом *c* (Cyt *c*) — гемосодержащим белком, в норме выступающим переносчиком электронов между комплексами III и IV дыхательной цепи (электронтранспортной, ЭТЦ) митохондрий и выходящим в цитоплазму при нарушении их работы. В результате взаимодействия Ngb и Cyt *c* блокируется запуск апоптоза по Cyt *c*-зависимому пути [12]. При этом ни точные механизмы этого взаимодействия, ни структура реакционного комплекса Ngb—Cyt *c* не установлены. Таким образом, актуальна задача выяснения механизмов взаимодействия Ngb с Cyt *c* как основы антиапоптотической функции Ngb. Для осуществления данной задачи необходима высокоэффективная система биосинтеза для наработки препаративных количеств водорастворимой холоформы Ngb с подтвержденными физико-химическими свойствами.

Цель настоящего исследования — разработка и оптимизация эффективной системы биосинтеза, выделения и очистки холоформы рекомбинантного Ngb человека в препаративных количествах и исследование физико-химических свойств полученного белка методами спектроскопии: в УФ-видимой области, кругового дихроизма (КД), комбинационного рассеяния и гигантского комбинационного рассеяния (КР и ГКР соответственно), инфракрасной (ИК), ЯМР и хромато-масс-спектрометрии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биосинтез, схема выделения и очистки рекомбинантного нейроглобина. К настоящему моменту известны несколько систем биосинтеза рекомбинантного Ngb [1, 5, 14, 15] в бактериальных штаммах-продуцентах. Однако они не в полной мере учитывают необходимость получения белка Ngb с корректно замкнутой дисульфидной связью (Cys46—Cys55), в связи с чем в работах исследуют либо мутант Ngb с заменой а.о. Cys46, Cys55, Cys120 на Gly и Ser [4, 5, 16], либо Ngb мыши [1, 5, 17], который отличается от Ngb человека отсутствием дисульфидного мостика в связи с заменой Cys46 на Gly [1]. Молекула Ngb содержит 3 а.о. цистеина: Cys46, Cys55 и Cys120, два из которых образуют внутримолекулярную дисульфидную связь (Cys46—Cys55), при этом Cys120 остается свободным [1, 4, 18]. Образование других внутримолекулярных дисульфидных связей в Ngb с участием Cys120 и Cys46 или Cys55 стерически невозможно [18, 19]. Несомненное значение дисульфидной связи Ngb человека определяется ее участием в формировании правильной вторичной структуры CD-петли и модулированием функциональной активности данного белка. В отсутствие дисульфидного мостика происходит укрепление связи между гемом и дистальным гистидином (His64), что снижает эффективность связывания внешних лигандов Ngb, т.к. диссоциация His64 от гемовой группы — необходимая и лимитирующая стадия реакции связывания Ngb с внешними лигандами [18]. Кроме того, S—S-связь Ngb значительно влияет на термодинамические параметры реакции восстановления гемового железа Ngb, таким образом модулируя активность Ngb как участника окислительно-восстановительных реакций [15].

Биосинтез рекомбинантного Ngb осуществляли в бактериальной системе *Escherichia coli*, для этого был выбран штамм SHuffle T7. Отличительная черта этого штамма — возможность наработки рекомбинантных белков с корректно замкнутыми дисульфидными связями [20], образование которых в клетках этого штамма достигается за счет делеций генов глутатионредуктазы и тиоредоксинредуктазы. В норме продукты этих генов содержатся в цитоплазме клеток бактерий и препятствуют образованию дисульфидных связей. Кроме то-

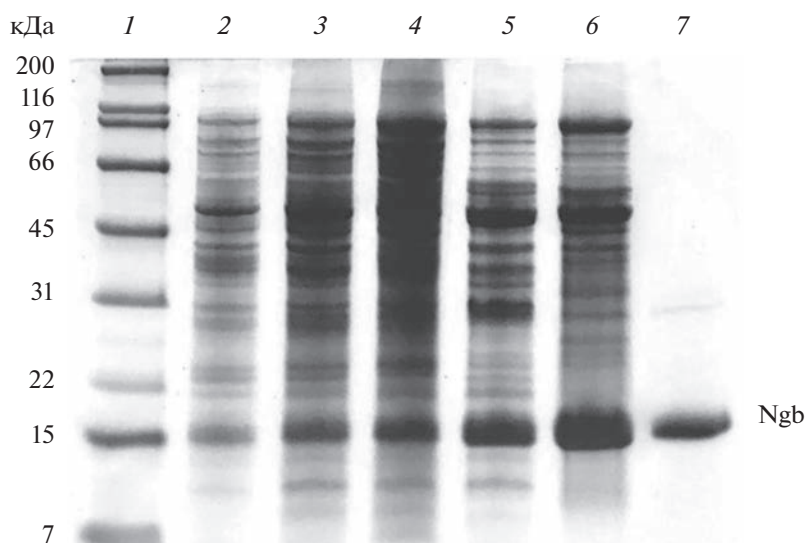


Рис. 1. Электрофоретический анализ в 12%-ном SDS-ПААГ (Tris-трициновая буферная система): 1 — стандарт молекулярных масс 7–200 кДа (Bio-Rad, США); 2 — суммарный белок клеток штамма-продуцента Ngb по окончании экспрессии; 3 — клеточный лизат после гомогенизации; 4 — ресуспандированный суммарный белок после высаливания; 5 — объединенные фракции с Ngb после анионообменной хроматографии; 6 — объединенные фракции с Ngb после повторного высаливания; 7 — очищенный препарат Ngb после гель-фильтрации.

го, штамм SHuffle T7 конститутивно продуцирует дисульфидизомеразу DsbC, которая способствует корректному замыканию S–S-связей, а также обладает шапероноподобными свойствами. Таким образом, этот штамм оптимален для продукции рекомбинантного Ngb, содержащего функционально активную дисульфидную связь.

В ходе оптимизации биосинтеза водорастворимой холоформы белка в бактериальных клетках проведен ряд экспериментов, в которых варьировались такие параметры, как состав ростовой среды, температура (25–37°C) и продолжительность инкубирования культуры штамма-продуцента (18–48 ч) (данные не приведены). В результате были подобраны оптимальные условия экспрессии гена Ngb: температура инкубирования 28°C, продолжительность экспрессии 24 ч, среда культивирования ТВ (в отсутствие индуктора экспрессии), при которых наблюдался высокий уровень наработки рекомбинантного Ngb (рис. 1, дорожка 2; рис. 2, врезка). При увеличении/уменьшении температуры или продолжительности инкубирования культуры клеток наблюдалось значительное снижение выхода белка.

На основе литературных данных [1, 5, 14, 15] разработан и оптимизирован протокол выделения и очистки рекомбинантного Ngb в виде холоформы. После гомогенизации клеточной биомассы с последующим удалением клеточного дебриса Ngb осаждали из супернатанта (рис. 1, дорожка 3) с помощью процедуры высаливания сульфатом аммония до 60%-ного насыщения (рис. 1, дорожка 4). На следующей стадии очистки белка ис-

пользовали анионообменную хроматографию на колонке с сорбентом МР HQ (рис. 1, дорожка 5). После этого проводили повторную процедуру высаливания с целью концентрирования препарата белка для нанесения на гель-фильтрационную колонку с Sephadex G-75 (рис. 1, дорожка 6). Выход белка, полученного при помощи разработанной схемы, в среднем составлял 8–10 мг с 1 л культуры клеток штамма-продуцента.

Гомогенность белка была подтверждена с помощью гель-электрофоретического анализа (рис. 1, дорожка 7) и спектрофотометрически в УФ-видимой области. Получены характерные спектры поглощения окисленной и восстановленной форм Ngb с максимумами при 412 и 424 нм соответственно (рис. 2), что подтверждает наличие правильно встроенного в белковую молекулу гемопорфирина.

КД-спектроскопия. На рис. 3а приведен КД-спектр Ngb в дальней УФ-области (190–250 нм) при двух разных концентрациях (1.0 и 0.2 мг/мл). Ранее было показано [21], что при низких концентрациях Ngb (~0.2 мг/мл) содержание α -спиралей, рассчитанное по полученным КД-спектрам, соответствует теоретически ожидаемому, тогда как при высоких концентрациях (~1.0 мг/мл) содержание α -спиралей уменьшается более чем вдвое. Авторы связывали данное явление с образованием димеров Ngb, мешающих получению корректных спектров. Однако нами эти результаты не были подтверждены: содержание α -спиралей при разных концентрациях существенно не изменялось и составляло 72.8% при концентрации 1.0 мг/мл и 70.3% при концентрации 0.2 мг/мл, что соответ-

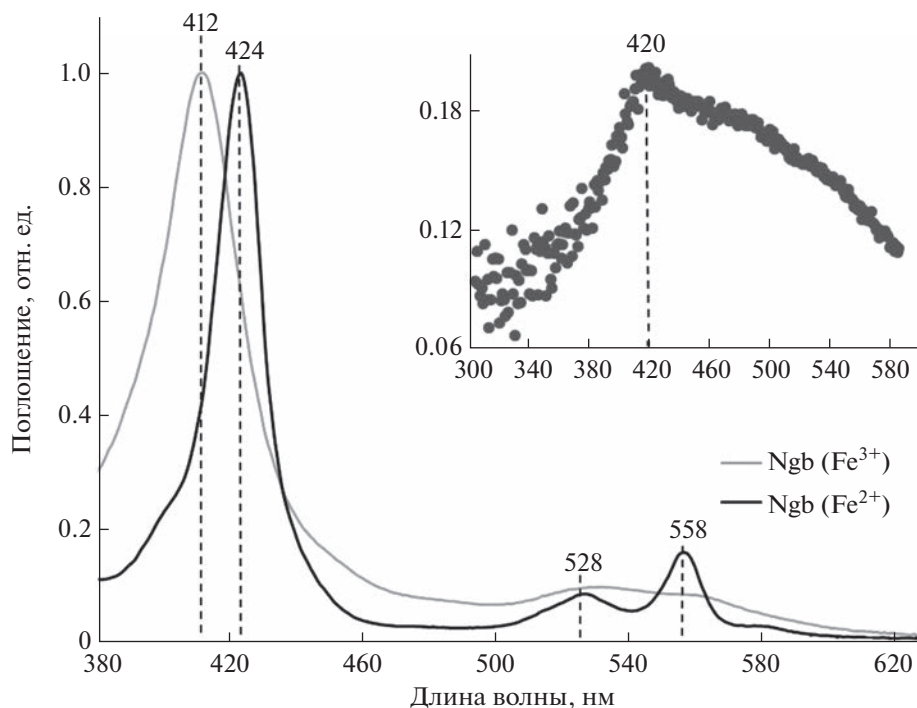


Рис. 2. Спектры поглощения в УФ-видимой области окисленной и восстановленной форм рекомбинантного Ngb. На врезке показан спектр поглощения, представляющий собой разность между спектром поглощения клеточной суспензии *E. coli* штамма-продуцента, активно синтезирующего Ngb, и спектром поглощения клеточной суспензии *E. coli* нетрансформированного штамма.

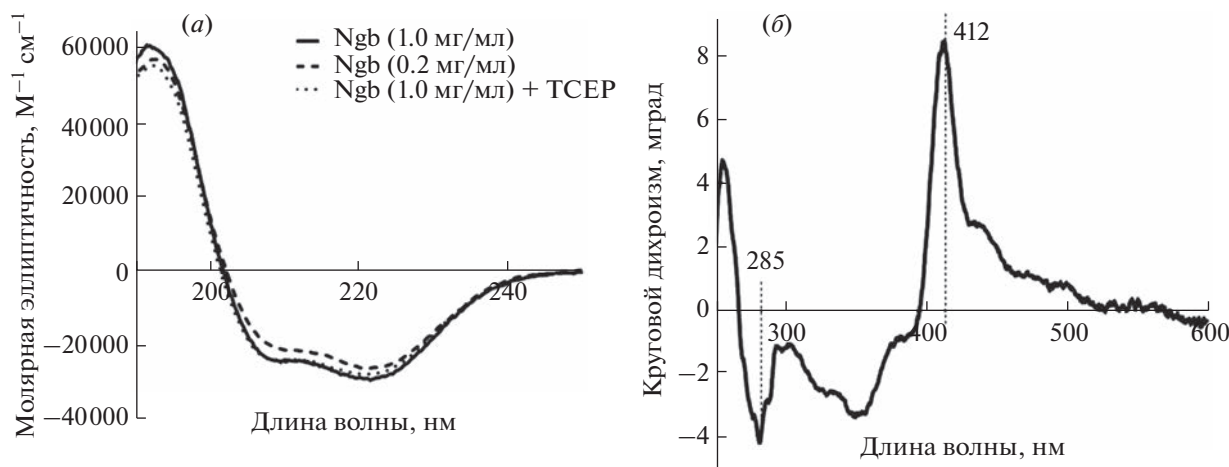


Рис. 3. Спектры КД рекомбинантного Ngb: (а) — в дальней УФ-области; (б) — в ближней УФ- и видимой областях.

ствуется расчетным данным для вторичной структуры Ngb (табл. 1). Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что разработанная нами система наработки Ngb позволяет снизить содержание димеров Ngb по сравнению с системами, предложенными ранее.

Добавление к препарату Ngb восстановительного агента ТСЕР (трис(2-карбоксиэтил)фосфин) (рис. 3а), в результате чего происходит разрыв как неспецифических межмолекулярных, так

и внутримолекулярных дисульфидных связей, вызывало изменение состава вторичной структуры Ngb (рис. 3а, табл. 1). После восстановления при помощи ТСЕР содержание α -спиралей снизилось с 72.8 до 69.1%, а содержание неупорядоченной структуры и β -поворота, напротив, повысилось с 17.1 до 19.2% и с 8.0 до 9.1% соответственно (табл. 1). Известно, что внутримолекулярная дисульфидная связь Ngb Cys46–Cys55 (CD5–D5) способствует укладке CD-петли в α -спираль. В

Таблица 1. Анализ вторичной структуры рекомбинантного Ngb

Образец	α -Спираль, %	β -Складчатый слой, %	β -Поворот, %	Неупорядоченная структура, %	NRMSD*
Ngb (1.0 мг/мл)	72.8	2.2	8.0	17.1	0.02
Ngb (0.2 мг/мл)	70.3	3.6	8.9	17.2	0.01
Ngb (1.0 мг/мл) + TCEP	69.1	2.6	9.1	19.2	0.01

* Приведенные значения нормализованных среднеквадратичных отклонений (NRMSD) использованы в качестве статистической оценки разницы между экспериментальным спектром и теоретическим спектром, рассчитанным на основе полученного состава вторичной структуры. Согласно данным Kelly et al. [22], значение NRMSD в расчетах должно быть <0.1 , что свидетельствует о высокой достоверности расчетов.

случае восстановленной S—S-связи CD-петля представляет собой сочетание β -поворота и неупорядоченной структуры [15]. Таким образом, данные результаты могут свидетельствовать о наличии S—S-связи в структуре рекомбинантного Ngb.

На рис. 3б приведен КД-спектр Ngb в ближней УФ и видимой областях (250–600 нм). Известно, что пик при 285 нм на КД-спектрах гемоглобинов имеет положительные значения в случае, когда белок связан с лигандом (например, молекулярный кислород), и отрицательные при отсутствии связи с лигандом [23]. Наличие данного пика определяется положением ароматических аминокислот; в случае Ngb, вероятнее всего, наибольший вклад вносит остаток Туг44, положение которого относительно гемовой впадины влияет на доступность гема для внешних лигандов [18]. Для Ngb пик при 285 нм имеет отрицательное значение, что соответствует его окисленному состоянию без лиганда. Пик в области 412 нм дополнительно подтверждает наличие правильно встроенной гемовой группы в белковой молекуле рекомбинантного Ngb. Таким образом, полученные результаты согласуются с данными о вторичной структуре Ngb [4, 21] и косвенно подтверждают наличие дисульфидной связи в структуре рекомбинантного Ngb.

Спектроскопия комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния. При помощи спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) была исследована конформация гемовой части изолированного рекомбинантного Ngb в восстановленной и окисленной формах соответственно (рис. 4). Как и в случае цитохромов, окисленный Ngb обладает сигналом КР низкой интенсивности, поэтому для усиления его КР были использованы плазмонные серебряные наноструктурированные поверхности, полученные при помощи метода, описанного ранее [24, 25]. При возбуждении лазером с длиной волны 532 нм на спектрах КР и ГКР, полученных для растворов Ngb (Fe^{2+}) и Ngb (Fe^{3+}) соответственно, выявлены характерные пики, связанные с колебаниями атомов в восстановленном и окисленном геме (табл. 2) (указаны положения максимумов пиков): 748 (колебания всех связей в геме), 1129–1130 (колебания метиль-

ных радикалов), 1306, 1342 и 1586 см^{-1} (колебания метиновых мостиков). Пики 1306 и 1342 см^{-1} — специфические пики, они присущи только гемам *b*-типа, что отличает спектры КР/ГКР белков, содержащих гем *b*-типа, от спектров белков, содержащих гем *c*-типа [31–33]. Кроме того, в КР-спектрах восстановленного Ngb присутствует характерный пик с положением максимума 1368 см^{-1} (“дыхание” пирролов), который сдвигается в положение 1375 см^{-1} в спектре окисленного Ngb. Также в спектре окисленного Ngb присутствует пик с положением максимума 1638 см^{-1} (колебания метиновых мостиков), который сдвигается в более низкочастотную область при восстановлении Ngb и сливается с более широким пиком с максимумом 1586 см^{-1} . Подобный сдвиг пиков при изменении редокс-состояния хорошо известен для гемсодержащих белков типа цитохромов, миоглобина и гемоглобина. Особенностью спектров Ngb также выступает то, что интенсивности пиков с положениями максимумов 748, 1129–1130, 1306, 1342 и 1586 см^{-1} существенно увеличиваются при восстановлении Ngb. Подобный эффект наблюдается для восстановленных цитохромов *c*- и *b*-типов, но не для мио- или гемоглобинов [31, 33].

Пик 1499 см^{-1} на спектрах Ngb (Fe^{2+}) характерен для гексакоординированного низкоспинового состояния гемового железа. Дополнительно гексакоординированность гемового железа подтверждает отсутствие пика в области 200–250 см^{-1} , характерного для пентакоординированного состояния [34, 35].

При возбуждении лазером с длиной волны 633 нм детектируются сигналы от белковой части Ngb, поскольку гемы *b*-типа не дают КР-спектр при возбуждении данным лазером. На рис. 5 показан разностный спектр, полученный путем вычитания КР-спектра окисленного Ngb из КР-спектра восстановленного Ngb. Такой подход был использован в связи с тем, что КР-спектры белка Ngb при данной длине волны возбуждения обладают низкой интенсивностью, а разностный спектр позволяет более точно локализовать области, в которых наблюдаются отличия. В исследуемом спектральном диапазоне наблюдаются пики с положениями максимумов 670 и 747 см^{-1} . Пик 670 см^{-1} ха-

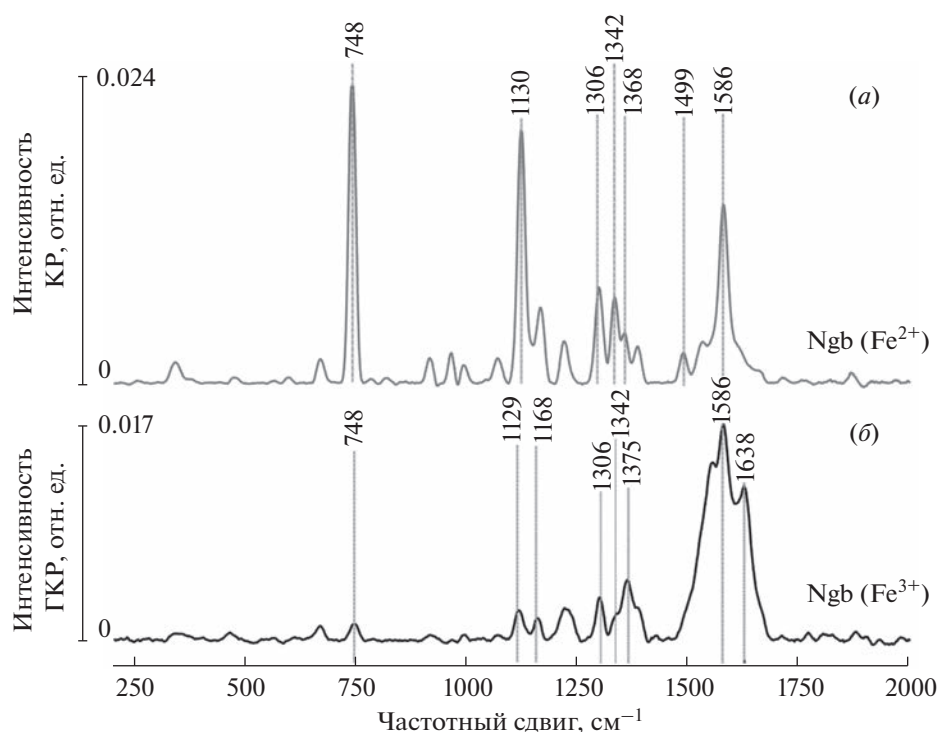


Рис. 4. (а) – Спектр ГКР нейроглобина (Fe^{3+} , 0.25 мМ), (б) – спектр КР нейроглобина (Fe^{2+} , 1.0 мМ) при лазерном возбуждении 532 нм. Для более удобного представления спектры нормированы на суммарную интенсивность соответствующего спектра.

Таблица 2. Описание основных пиков на спектре ГКР нейроглобина (Fe^{3+}) и на спектре КР нейроглобина (Fe^{2+}) при возбуждении лазером 532 нм

Значение частотного сдвига, см^{-1}		Характеристика	Источник
окисленная форма Ngb	восстановленная форма Ngb		
748 (w)	748 (vs)	Все связи в геме, “дыхание” порфирина	[26, 27]
1129 (m)	1130 (vs)	Колебание боковых радикалов C_bCH_3	[27]
1168 (w)	1168 (s)	Асимметричное колебание пиррольных колец	[27]
1342	1342 (s)	Все связи в геме, характерен только для гема <i>b</i> -типа	[28, 29]
Отсутствует	1368 (w)	“Дыхание” пирролов, симметричные колебания групп C_aN , C_aC_b в восстановленном геме (Fe^{2+})	[30]
1375 (m)	Отсутствует	“Дыхание” пирролов, симметричные колебания групп C_aN , C_aC_b в окисленном геме (Fe^{3+})	[27, 30]
1586 (vs)	1586 (vs)	Колебания метиновых мостиков: групп C_aC_m , $\text{C}_a\text{C}_m\text{H}$	[30]
1638 (vs)	Отсутствует	Колебания групп C_aC_m , $\text{C}_a\text{C}_m\text{H}$, C_aC_b в окисленном геме	[28]

Примечание: vs – очень интенсивный пик, s – интенсивный пик, m – пик средней интенсивности, w – пик низкой интенсивности. C_a – атом углерода в пиррольном кольце, связанный с азотом; C_b – атом углерода в пиррольном кольце, связанный с радикалами; C_m – атом углерода в метиновом мостике, связанный с углеродами пиррольных колец.

рактизует колебания связей C–S или S–H в цистеиновых остатках Ngb. Данная особенность разностного спектра свидетельствует о том, что в восстановленном Ngb Cys46 и Cys55 находятся в

свободном состоянии, тогда как в окисленной форме между ними образуется дисульфидный мостик Cys46–Cys55 [36]. Наличие пика с положением 747 см^{-1} в разностном спектре говорит об

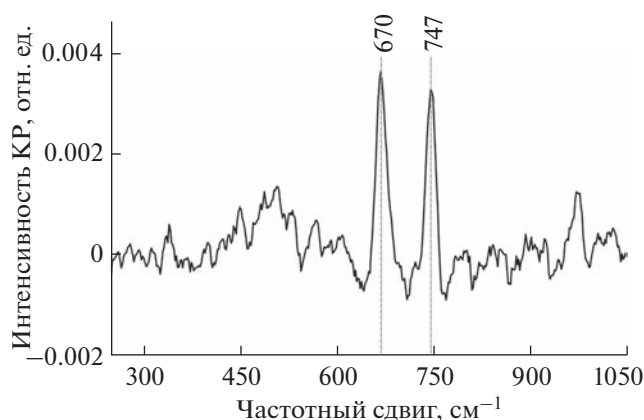


Рис. 5. Разностный спектр КР нейроглобина (1.0 мМ) при лазерном возбуждении 633 нм, полученный вычитанием нормированного КР-спектра Ngb (Fe³⁺) из нормированного КР-спектра Ngb (Fe²⁺).

отличиях в колебании связей С–N в белковой части восстановленного и окисленного Ngb, что может быть связано с отличием в конформации белка или в изменении взаимного расположения α -спиралей при переходе Ngb между редокс-формами.

ИК-спектроскопия. На рис. 6 представлен ИК-спектр растворенного в фосфатном буфере изолированного рекомбинантного Ngb. Пик 1651 см⁻¹ (Амид I) обусловлен колебаниями связей С=О в полипептидной цепи и характерен для α -спиральной укладки белка [37]. Характерный пик 1552 см⁻¹ в области полосы Амида II, соответствующий N–H- и С–N-колебаниям пептидных связей, несимметричным колебаниям карбоксильных групп (COO⁻) [38, 39], также может свидетельствовать в пользу α -спиральной структуры [40]. Пик 1244 см⁻¹ в области Амида III соответствует колебаниям длины пептидных связей С–N, а также деформационным колебаниям боковых цепей OH и NH аминокислотных остатков [41, 42]. Изменение интенсивности данных пиков на ИК-спектрах, а также их смещение наблюдается при межмолекулярных взаимодействиях белков [41].

Хромато-масс-спектрометрический анализ. Установление порядка замыкания S–S-связей в рекомбинантном нейроглобине проводили с помощью хромато-масс-спектрометрического анализа Cys-содержащих пептидных фрагментов, полученных путем трипсинолиза рекомбинантного Ngb, модифицированного хлорацетамидом (CAA). Остатки Cys в Ngb карбамидометилировали как в отсутствие, так и в присутствии восстановителя дисульфидных связей ТСЕР. Результаты хромато-масс-спектрометрического анализа пептидных продуктов трипсинолиза приведены в табл. 3. Нетрудно заметить, что в отсутствие восстановителя ТСЕР содержание CAA-модифицированного пептида CLGPAFTPATR (Cys120–130)

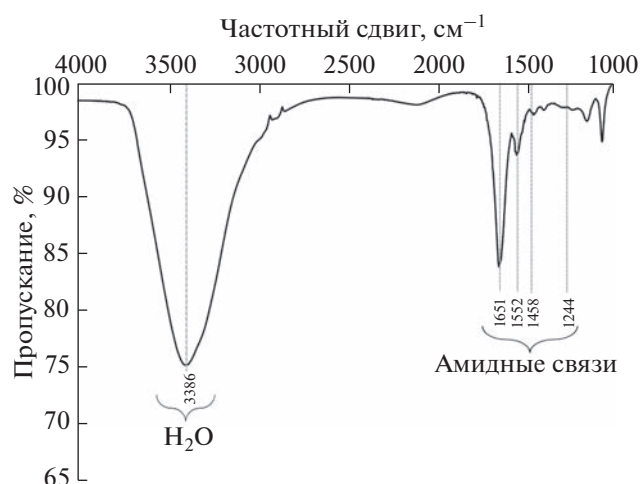


Рис. 6. ИК-спектр окисленного Ngb (1.0 мМ). В ИК-спектре присутствуют характерные пики в области колебаний пептидных связей: полоса Амид I (1651 см⁻¹), Амид II (1552–1458 см⁻¹) и Амид III (1244 см⁻¹).

существенно превышает содержание пептидов: QFSSPEDCLSSPEFLDHIR (48-Cys55–66) – в 2.5 раза и QFSSPEDCLSSPEFLDHIRK (48-Cys55–67) – в 110 раз. В то же время в присутствии ТСЕР содержание пептида (Cys120–130) ниже на 3 порядка, чем пептида (48-Cys55–66), и на 2 порядка, чем пептида (48-Cys55–67). С учетом того, что образование дисульфидных связей между Cys120 и двумя оставшимися Cys55 и Cys46 стерически невозможно [18, 19], данные результаты свидетельствуют о том, что Cys55 в отсутствие восстановителя находится в связанном S–S-связью состоянии с Cys46, в то время как Cys120 не участвует в формировании внутримолекулярных дисульфидных связей.

ЯМР-спектроскопия. Характерная дисперсия ЯМР-сигналов на представленных на рис. 7 одномерном ¹H- и двумерном ¹H/¹H-спектрах указывает на то, что рекомбинантный Ngb со встроенным гемом свернут предположительно в нативную конформацию, обогащенную α -спиральной структурой. Вместе с тем присутствие в ЯМР-спектрах одного набора сигналов означает отсутствие белковых примесей и однородность рекомбинантного препарата, что при условии ¹³C, ¹⁵N-изотопного мечения белка позволяет в дальнейшем провести ЯМР-исследования для получения детальной структурно-динамической информации на атомном уровне.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы производства фирм AppliChem (Германия), Sigma-Aldrich (США), Serva (США), Fermentas (Латвия), Bio-Rad (США) и Химмед (Россия). Дистиллирован-

Таблица 3. Характеристики идентифицированных Cys-содержащих триптических фрагментов рекомбинантного Ngb, модифицированного хлорацетамидом (CAA)

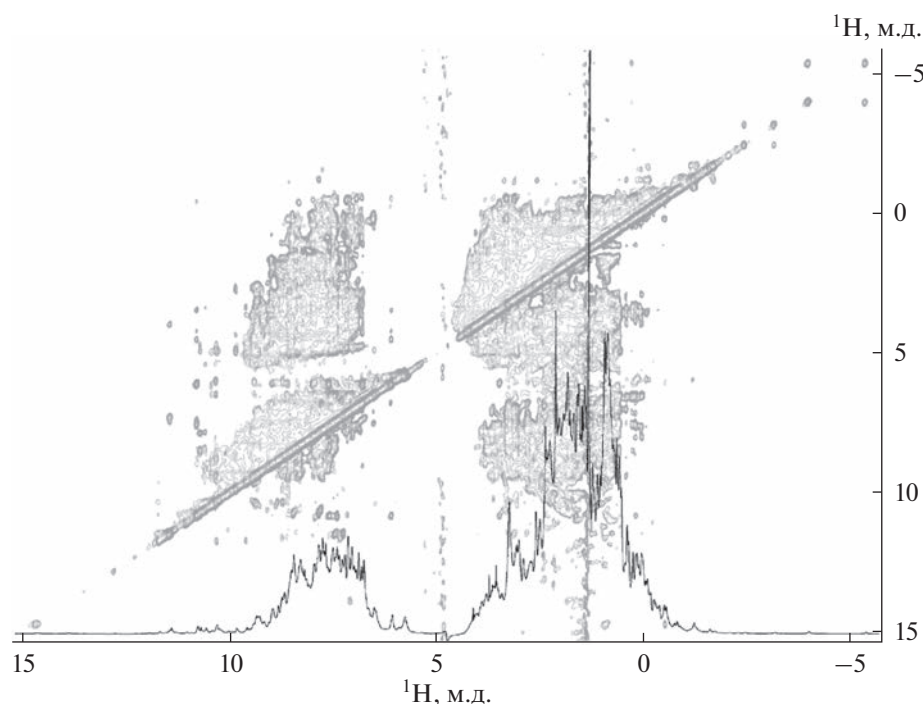
Последовательность пептида	$-10\lg P^{**}$	M	М.д.***	Площадь пика в образце (TCEP + CAA)	Площадь пика в образце (CAA)	Старт [#]	Стоп [#]
LFALPDLLPLFQYNC(+57.02)*R	46.86	2108.076	2.2	1.50×10^6	—	31	47
QFSSPEDC(+57.02)LSSPEFLDHIRK	80.10	2391.117	2.0	7.87×10^8	1.03×10^7	48	67
QFSSPEDC(+57.02)LSSPEFLDHIR	78.16	2263.022	2.8	6.87×10^9	4.58×10^8	48	66
C(+57.02)LGPAFTPATR	62.46	1189.591	2.3	5.39×10^7	1.14×10^9	120	130

* C(+57.02) – карбамидометилованный остаток Cys.

** $-10\lg P$ – величина, характеризующая достоверность идентификации пептида, где P – абсолютная вероятность.

*** М.д. – миллионные доли, отличие массы идентифицированного пептида от ее теоретических значений.

[#] Старт и Стоп – номер N - и C -концевых остатков соответственно пептидного фрагмента в последовательности белка.

**Рис. 7.** Одномерный ^1H - и двумерный $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектры рекомбинантного Ngb (0.5 мМ).

ную воду дополнительно очищали с помощью системы Milli-Q (Millipore, США).

Штаммы бактерий и ростовые среды. В работе использовали штаммы бактерий *E. coli*: SHuffle T7 (NEB, США) и JM-109 (Promega, США). Клетки *E. coli* выращивали в средах LB или TB [23] в зависимости от поставленной задачи. Твердые среды содержали 1.5% агара. При необходимости в среду добавляли антибиотик ампициллин (100–120 мкг/мл).

Генно-инженерные методы. Адаптированная для экспрессии в бактериальных штаммах (*E. coli*) последовательность гена, кодирующего Ngb че-

ловека [43], синтезирована из олигонуклеотидных праймеров в ЗАО “Евроген” (Россия). Полученный ген Ngb встраивали в плазмидный вектор pET-17b (Novagen, США) по сайтам рестрикции Kpn I и Nde I. Выделение плазмидной ДНК, электрофоретический анализ образцов ДНК и трансформацию бактериальных штаммов выполняли по стандартным методикам [44].

Экспрессия рекомбинантного гена. Клетки штамма *E. coli* SHuffle T7, трансформированные плазмидой pET-17b-Ngb, содержащей ген, кодирующий Ngb человека, выращивали в среде Terrific Broth (TB) (12 г/л бактотриптона, 24 г/л

дрожжевого экстракта, 0.04% глицерина и 1/10 объема раствора фосфатов: 0.17 М KH_2PO_4 , 0.72 М K_2HPO_4 , pH 7.4) до значения OD_{595} 0.5–0.6. Экспрессию осуществляли без добавления индуктора при 28°C и встряхивании (220 об/мин) в течение 24 ч, после чего биомассу клеток осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 6000 g.

Выделение и очистка рекомбинантного белка Ngb. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в буфере для лизиса (25 mM Tris-HCl, pH 8.5, 1 mM NaN_3). Клеточную суспензию гомогенизировали под высоким давлением с помощью установки French Press (Spectronic Instruments, Inc., США). После этого гомогенат центрифугировали при 95000 g и 4°C в течение 20 мин для осаждения клеточного дебриса. Далее Ngb осаждали из супернатанта путем высаливания сульфатом аммония до 60%-ного насыщения и центрифугировали при 50000 g и 4°C в течение 15 мин. Полученный осадок ресуспендировали в буфере (25 mM Tris-HCl, pH 8.5, 1 mM NaN_3) и проводили интенсивный диализ против того же буфера. На следующих стадиях очистки белка использовали систему жидкостной хроматографии АКТА FPLC (GE Healthcare, США). Анионообменную хроматографию проводили на колонке с сорбентом MP HQ (Bio-Rad, США). Белок элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl со скоростью 2 мл/мин в том же буфере. Фракции, обогащенные целевым белком, концентрировали путем повторного высаливания, после чего осадок ресуспендировали в 50 mM натрий-фосфатном буфере, содержащем 150 mM NaCl, 1 mM NaN_3 , pH 7.0, и наносили на гель-фильтрационную колонку GL 10/500 (Pharmacia, Швеция) с сорбентом Sephadex G-75 (Pharmacia, Швеция). Очищенный белок диализовали против буфера 10 mM NH_4HCO_3 , pH 7.9, затем лиофилизировали и хранили при –20°C.

Аналитические методы. Концентрацию Ngb определяли по поглощению, измеряемому при длине волны 412 нм с использованием спектрофотометра Cary-50 (Varian, США) с учетом расчетного молярного коэффициента поглощения $\epsilon_{412} = 129000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [45]. Для получения спектра клеток штамма-продуцента клетки предварительно отмывали от компонентов среды культивирования в 0.1 М калий-фосфатном буфере, затем ресуспендировали в том же буфере [46]. Регистрировали следующие спектры: 1) спектры суспензии клеток *E. coli* SHuffle T7, активно продуцирующих Ngb; 2) спектры суспензии клеток *E. coli* SHuffle T7, выращенных при тех же условиях, но не трансформированных вектором pET-17b-Ngb. Далее производили вычитание спектра 2 из спектра 1. При этом OD_{595} суспензий клеток *E. coli* SHuffle T7, активно продуцирующих Ngb и не трансформированных вектором, были равными.

Все этапы наработки, выделения и очистки белков контролировали с помощью электрофоре-

за в 12%-ном SDS-ПААГ в Tris-трициновой буферной системе [47].

Спектры КД получали на спектрополяриметре J-810 (JASCO, Япония) в диапазоне 190–250 нм в кювете толщиной 0.01 см, а также в диапазоне 250–600 нм в кювете толщиной 1.0 см при комнатной температуре. Концентрации Ngb в исследуемых образцах составляли 1.0 и 0.2 мг/мл (при измерениях в дальнем УФ) и 0.4 мг/мл (в ближнем УФ и в видимой области). Измерения проводили в 10 mM калий-фосфатном буфере, pH 7.2. Запись спектров осуществляли с шагом 0.2 нм (скорость сканирования 20 нм/мин) и шириной оптической щели 1 нм, выполняли усреднение по четырем спектрам. Для расчета вторичной структуры использовали программу CONTINLL (пакет CDDPro, Colorado State University, США).

Спектры КР и ГКР получали на КР-микроспектрометре NTEGRA Spectra (NT-MDT, Зеленоград, Россия), соединенном с инвертированным микроскопом IX-71 (Olympus, Япония). Лазерное возбуждение 532 нм использовали для регистрации резонансного КР/ГКР от гема восстановленного или окисленного Ngb, а лазерное возбуждение 633 нм — для регистрации КР-спектров от белковой части окисленного и восстановленного Ngb. Мощности лазеров были не более 1 и 3 мВт соответственно. Для получения ГКР-спектра окисленного Ngb раствор белка с концентрацией 0.25 mM в объеме 30–50 мкл помещали в чашку Петри со стеклянным дном и сверху накрывали стеклом с нанесенной серебряной наноструктурированной поверхностью. Фокусировали лазер на слое жидкости около наноструктурированной поверхности, при этом использовали объектив $\times 20$ с числовой апертурой 0.45; время измерения составляло 30–120 с, диаметр лазерного пятна ~800 нм. Измеряли образцы Ngb с концентрацией 0.25–1 mM в 30 mM натрий-фосфатном буфере, pH 6.5, при комнатной температуре. Для получения спектров гема восстановленной формы Ngb на дно стеклянной чашки Петри помещали 30 мкл раствора окисленного Ngb, а затем добавляли избыток кристаллов NADPH. О полном восстановлении Ngb судили по исчезновению пика с положением максимума при 1375 cm^{-1} . Обычно на полное восстановление нейроглобина уходило 1–2 мин после добавления NADPH. В химическом окислении Ngb для получения спектров окисленной формы Ngb не было необходимости, т.к. рекомбинантный Ngb выделяли в полностью окисленном виде. Спектры КР белковой части Ngb получали для исходного раствора окисленного Ngb и для раствора восстановленного Ngb (полученного из окисленного нейроглобина при добавлении NADPH) путем помещения растворов на стеклянное дно чашки Петри без дополнительного использования наноструктур. Для обработки спектров использовали открытое программное обеспечение Pyraman [48].

Синтез наноструктур типа серебряных колец осуществляли по методике, разработанной ранее [25]. Для синтеза растворяли 2.93 г нитрата серебра в 40 мл воды Milli-Q. Также растворяли 7 г NaOH в 30 мл воды и затем приливали тонкой струей при перемешивании к раствору нитрата серебра, при этом выпадал темный осадок. Осадок трижды промывали водой Milli-Q по 100 мл, затем растворяли в 25 мл Milli-Q и 5 мл концентрированного раствора аммиака до исчезновения осадка. Покровные стекла, отмытые в детергенте и выдержанные в течение 5 мин в ультразвуковой ванне, высушивали на воздухе и помещали в термически устойчивый стеклянный стакан на 1 л. Стакан устанавливали на нагревающую поверхность, предварительно разогретую до 380°C. Раствор аммиачного комплекса серебра (30 мл) переливали в емкость ультразвукового распылителя (Альбеда, Россия) и распыляли на поверхность покровных стекол медленными круговыми движениями при нагревании до 380°C, делая перерывы по 5 мин через каждые 3 мин. Расстояние сопла распылителя до покровных стекол составляло 1.5–2.0 см. После распыления стекла выдерживали 15 мин при 400°C, после чего охлаждали и упаковывали в светонепроницаемые капсулы. В результате на стеклах формировались сложные иерархические структуры из металлического серебра. Полученные таким способом наноструктуры сохраняли стабильность в течение нескольких месяцев.

ИК-спектры окисленного Ngb получали на ИК-спектрометре Spectrum Two FT-IR (Perkin Elmer, США). Измеряли образцы окисленного Ngb с концентрацией 1.0 мМ в 30 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 6.5, при комнатной температуре. Для вычитания базовой линии и дальнейшей обработки спектров использовали программу SpectraGryph (США). Спектр Ngb получали вычитанием нормированного по пику 3386 см⁻¹ спектра воды из нормированного спектра раствора Ngb.

Получение Cys-САА-модифицированных триптических фрагментов рекомбинантного Ngb. Навески по 10 мкг рекомбинантного Ngb растворяли в буферных растворах, содержащих следующие компоненты: 1) 100 мМ Tris, pH 8.5, 10 мМ ТСЕР и 20 мМ хлорацетамида (САА); 2) 100 мМ Tris, pH 8.5, 20 мМ САА. После инкубации в течение 1 ч при 37°C к образцам добавляли трипсин в весовом соотношении 1 : 100 по отношению к гидролизуемому белку. После инкубации рекомбинантного белка при 37°C в течение ночи полученный гидролизат анализировали методом хромато-масс-спектрометрии.

Хромато-масс-спектрометрический анализ. Исследуемые образцы загружали на изготовленную в лаборатории предколонку 50 × 0.1 мм, упакованную сорбентом Inertsil ODS3 3 μm (GL Sciences, Япония), в растворе, содержащем 2% ацетонитрила, 98% Н₂О, 0.1% ТФУ, при скорости потока 4 мкл/мин и разделяли при комнатной

температуре на колонке из плавленного кварца 300 × 0.1 мм с эмиттером, изготовленной на приборе P2000 Laser Puller (Sutter, США) и упакованной в лаборатории сорбентом Reprosil PUR C18AQ 1.9 (Dr. Maisch, Германия). Обращенно-фазовую хроматографию проводили на хроматографе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific, США), соединенном с масс-спектрометром Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, США) посредством наноэлектроспрейного источника (Thermo Fisher Scientific, США). Для хроматографического разделения пептидов использовали системы растворителей А (99.9% воды, 0.1% муравьиной кислоты) и Б (19.9% воды, 0.1% муравьиной кислоты, 80% ацетонитрила). Пептиды элюировали с колонки линейным градиентом: 3% Б 3 мин, 3–6% Б за 2 мин; 6–30% Б за 50 мин, 30–55% Б за 10 мин, 55% Б 2 мин, 55–99% Б за 0.1 мин, 99% Б 2 мин, 99–3% Б за 0.1 мин при скорости потока 500 нл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме DDA (TopN = 10) со следующими настройками прибора: MS1-сканирование – разрешение 70000, диапазон сканирования 200–1600 *m/z*, максимальное время инъекции ионов 35 мс, уровень AGC 3 × 10⁶, MS2-сканирование – разрешение 17500, HCD-фрагментация с энергией 30%, максимальное время инъекции ионов 80 мс, уровень AGC 1 × 10⁵.

ЯМР-спектроскопия. Готовили раствор рекомбинантного Ngb с концентрацией 0.5 мМ в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7.0, содержащем 20 мМ NaCl и 5% D₂O, и помещали в 5-мм ЯМР-ампулу. Одномерный ¹H- и двумерный ¹H/¹H-NOESY- (время смешивания 100 мс) спектры накапливали при 30°C на спектрометре AVANCE 600 (Bruker, Германия) с рабочей частотой на протонах 600 МГц, оборудованном криогенно охлаждаемым датчиком.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и оптимизирована эффективная система биосинтеза, выделения и очистки рекомбинантного нейроглобина человека, которая позволила наработать Ngb в количествах, достаточных для анализа его физико-химических свойств, а также дальнейшего детального исследования функциональных свойств. Согласно данным УФ-видимой, ИК- и КД- и ЯМР-спектроскопии, рекомбинантный Ngb представляет собой правильно структурированную холоформу белка. Получены характеристические спектры КР и ГКР гема для восстановленной и окисленной форм Ngb соответственно. Данные результаты служат основой для дальнейших исследований механизма нейротекторной функции Ngb при его взаимодействии с митохондриальным Cyt c.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00985).

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. *Burmester T., Weich B., Reinhardt S., Hankeln T.* // *Nature*. 2000. V. 407. P. 520–523. <https://doi.org/10.1038/35035093>
2. *Hundahl C.A., Allen G.C., Hannibal J., Kjaer K., Rehfeld J.F., Dewilde S., Nyengaard J.R., Kelsen J., Hay-Schmidt A.* // *Brain Res.* 2010. V. 17. P. 58–73. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.056>
3. *Bentmann A., Schmidt M., Reuss S., Wolfrum U., Hankeln T., Burmester T.* // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 20660–20665. <https://doi.org/10.1074/jbc.m501338200>
4. *Pesce A., Dewilde S., Nardini M., Moens L., Ascenzi P., Hankeln T., Burmester T., Bolognesi M.* // *Structure*. 2003. V. 11. P. 1087–1095. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(03\)00166-7](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(03)00166-7)
5. *Dewilde S., Kiger L., Burmester T., Hankeln T., Baudin-Creux V., Aerts T., Marden M.C., Caubergs R., Moens L.* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 38949–38955. <https://doi.org/10.1074/jbc.m106438200>
6. *Hankeln T., Ebner B., Fuchs C., Gerlach F., Haberkamp M., Laufs T.L., Roesner A., Schmidt M., Weich B., Wystub S., Saaler-Reinhardt S., Reuss S., Bolognesi M., De Sanctis D., Marden M.C., Kiger L., Moens L., Dewilde S., Nevo E., Avivi A., Weber R.E., Fago A., Burmester T.* // *J. Inorg. Biochem.* 2005. V. 99. P. 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.11.009>
7. *Petersen M.G., Dewilde S., Fago A.* // *J. Inorg. Biochem.* 2008. V. 102. P. 1777–1782. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.05.008>
8. *Tiso M., Tejero J., Basu S., Azarov I., Wang X., Simplaceanu V., Frizzell S., Jayaraman T., Geary L., Shapiro C., Ho C., Shiva S., Kim-Shapiro D.B., Gladwin M.T.* // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 18277–18289. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.159541>
9. *Brittain T., Skommer J., Henty K., Birch N., Raychaudhuri S.* // *IUBMB Life*. 2010. V. 62. P. 878–885. <https://doi.org/10.1002/iub.405>
10. *Burmester T., Hankeln T.* // *Acta Physiol. (Oxf)*. 2014. V. 211. P. 501–514. <https://doi.org/10.1111/apha.12312>
11. *Guidolin D., Tortorella C., Marcoli M., Maura G., Agnati L.F.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. P. 1817. <https://doi.org/10.3390/ijms17111817>
12. *Brittain C., Bommarco R., Vighi M., Barmaz S., Settele J., Potts S.G.* // *Agricult. For. Entomol.* 2010. V. 12. P. 259–266. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2010.00485.x>
13. *Burmester T., Hankeln T.* // *J. Exp. Biol.* 2009. V. 212. P. 1423–1428. <https://doi.org/10.1242/jeb.000729>
14. *Dewilde S., Mees K., Kiger L., Lechauve C., Marden M.C., Pesce S., Bolognesi M., Moens L.* // *Methods Enzymol.* 2008. V. 436. P. 341–357. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(08\)36019-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(08)36019-4)
15. *Belleia M., Bortolotta C.A., Roccoa G.D., Borsarib M., Lancellottib L., Ranieria A., Solaa M., Battistuzzi G.* // *J. Inorg. Biochem.* 2018. V. 178. P. 70–86. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.10.005>
16. *Hamdane D., Kiger L., Dewilde S., Green B.N., Pesce A., Uzan J., Burmester T., Hankeln T., Bolognesi M., Moens L., Marden M.C.* // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 51713–51721. <https://doi.org/10.1074/jbc.m309396200>
17. *Fago A., Mathews A.J., Moens L., Dewilde S., Brettain T.* // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. P. 4884–4888. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.003>
18. *Guimaraes B.G., Hamdane D., Lechauve C., Marden M.C., Golinelli-Pimpaneau B.* // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2014. V. 70. P. 1005–1014. <https://doi.org/10.1107/s1399004714000078>
19. *Hamdane D., Kiger L., Dewilde S., Green B.N., Pesce A., Uzan J., Burmester T., Hankeln T., Bolognesi M., Moens L., Marden M.C.* // *Micron*. 2004. V. 35. P. 59–62. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2003.10.019>
20. *Lobstein J., Emrich C.A., Jeans C., Faulkner M., Riggs P., Berkmen M.* // *Microb. Cell Fact.* 2012. V. 11. P. 56. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-56>
21. *Chao Z., Lianzhi L., Li W., Haiwei J.* // *Chinese Sci. Bull.* 2006. V. 51. P. 2581–2585. <https://doi.org/10.1007/s11434-006-2144-7>
22. *Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. V. 1751. P. 119–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>
23. *Geraci G., Parkhurst L.J.* // *Methods Enzymol.* 1981. V. 76. P. 262–275. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(81\)76127-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(81)76127-5)
24. *Chertkova R.V., Firsov A.M., Brazhe N.A., Nikelsparg E.I., Bochkova Z.V., Bryntseva T.V., Semenova M.A., Baizhumanov A.A., Kotova E.A., Kirpichnikov M.P., Maksimov G.V., Antonenko Y.N., Dolgikh D.A.* // *Biomolecules*. 2022. V. 12. P. 665. <https://doi.org/10.3390/biom12050665>
25. *Semenova A.A., Goodilin E.A., Brazhe N.A., Ivanov V.K., Baranchikov A.E., Lebedev V.A., Goldt A.E., Sosnovtseva O.V., Savilov S.V., Egorov A.V., Brazhe A.R., Pershina E.Y., Luneva O.G., Maksimov G.V., Tretyakov Y.D.* // *J. Mater. Chem.* 2012. V. 22. P. 24530–24544. <https://doi.org/10.1039/C2JM34686A>
26. *Rygula A., Majzner K., Marzec K.M., Kaczor A., Pilarczyk M., Baranska M.* // *J. Raman Spectrosc.* 2013. V. 44. P. 1061–1076. <https://doi.org/10.1002/JRS.4335>
27. *Brazhe N.A., Treiman M., Brazhe A.R., Find N.L., Maksimov G.V., Sosnovtseva O.V.* // *PLoS One*. V. 7. P. e41990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041990>
28. *Kakita M., Kaliaperumal V., Hamaguchi H.* // *J. Biophotonics*. 2011. V. 5. P. 20–24. <https://doi.org/10.1002/jbio.201100087>
29. *Buzgar N., Buzatu A., Sanislav I.* // *An. Stiint. Univ. Al. I. Cuza Iasi. Geol.* 2009. V. 55. P. 5–23.

30. Hu S., Morris I.K., Singh J.P., Smith K.M., Spiro T.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. V. 115. P. 12446–12458. <https://doi.org/10.1021/ja00079a028>
31. Brazhe N.A., Treiman M., Faricelli B., Vestergaard J.H., Sosnovtseva O.V. // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. e70488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070488>
32. Chertkova R.V., Brazhe N.A., Bryntseva T.V., Nekrasov A.N., Dolgikh D.A., Yusipovich A.I., Sosnovtseva O.V., Maksimov G.V., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P. // *PLoS One*. 2017. V. 12. P. e0266695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266695>
33. Ogawa M., Harada Y., Yamaoka Y., Fujita K., Yaku H., Takamatsu T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 382. P. 370–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.028>
34. Couture M., Burmester T., Hankeln T., Rousseau D.L. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 36377–36382. <https://doi.org/10.1074/jbc.m103907200>
35. Couture M., Das T.K., Savard P.Y., Ouellet Y., Wittenberg J.B., Wittenberg B.A., Rousseau D.L., Guertin M. // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 4770–4780. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01531.x>
36. Bazylewski P., Divigalpitiya R., Fanchini G. // *RSC Adv.* 2017. V. 7. P. 2964–2970. <https://doi.org/10.1039/C6RA25879D>
37. Dong A., Huang P., Caughey W.S. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. P. 3303–3308. <https://doi.org/10.1021/bi00465a022>
38. Moss D., Nabadryk E., Breton J., Mantele W. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 187. P. 565–572. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15338.x>
39. Sun Y., Benabbas A., Zeng W., Kleingardner J.G., Bren K.L., Champion P.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. P. 6570–6575. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322274111>
40. Venyaminov S.Y., Kalnin N.N. // *Biopolymers*. 1990. V. 30. P. 1259–1271. <https://doi.org/10.1002/bip.360301310>
41. Тен Г.Н., Герасименко А.Ю., Щербакова Н.Е., Баранов В.И. // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика*. 2019. Т. 19. С. 43–57.
42. Nucara A., Maselli P., Giliberti V., Carbonaro M. // *SpringerPlus*. 2013. V. 2. P. 661. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-661>
43. STAT5A (NM_003152) Human Tagged ORF Clone. https://www.origene.com/catalog/cdna-clones/expression-plasmids/rc207482/neuroglobin-ngb-nm_021257-human-tagged-orf-clone
44. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 1989.
45. Nicolis S., Monzani E., Ciaccio C., Ascenzi P., Moens L., Casella L. // *Biochem. J.* 2007. V. 407. P. 89–99. <https://doi.org/10.1042/bj20070372>
46. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Topunov A.F. // *Molecules*. 2021. V. 26. P. 7207. <https://doi.org/10.3390/molecules26237207>
47. Schagger H., Jagow G. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 166. P. 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
48. Brazhe A.R. <https://github.com/abrazhe/pyraman>

Development of a System for Biosynthesis, Isolation and Purification of Holoform of Recombinant Human Neuroglobin and Its Characteristics

M. A. Semenova*, Z. V. Bochkova*, **, O. M. Smirnova*, A. A. Ignatova*, E. Y. Parshina**, R. H. Ziganshin*, E. V. Bocharov*, N. A. Brazhe**, G. V. Maksimov**, M. P. Kirpichnikov*, ***, D. A. Dolgikh*, ***, and R. V. Chertkova*,#

#Phone: +7 (903) 772-86-54; e-mail: cherita@inbox.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, ul. Miklukho–Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Biophysics Department, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

***Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

An efficient system for the biosynthesis, isolation and purification of recombinant human neuroglobin has been developed and optimized, which makes it possible to produce protein in quantities sufficient to study its properties. According to UV-visible, IR-, CD-, and NMR spectroscopy data, recombinant neuroglobin is a structured protein in the holoform state. The data of chromato-mass-spectrometric analysis made it possible to conclude that there is a correctly formed disulfide bond in the structure of the oxidized form of the protein. Using Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy with laser excitation at 532 nm, it was shown that heme in the reduced and oxidized forms of neuroglobin has vibrational degrees of freedom typical of *b*-type hemes, and the iron atom is six-coordinated. Using Raman spectroscopy with laser excitation at 633 nm, it was found that reduced –SH-groups were present in reduced neuroglobin, while in oxidized neuroglobin disulfide bridge was formed. The results obtained serve as the basis for detailed studies of the mechanism of the functioning of neuroglobin as a neuroprotector, in particular, during its interaction with oxidized cytochrome *c*, which is released from mitochondria in violation of their functioning and/or morphology.

Keywords: neuroglobin, recombinant proteins, heme-containing proteins, globins