СОДЕРЖАНИЕ

Том 39, номер 3, 2022

обзоры

Гемостаз и тромбоз. Пространственная организация биохимических	
М. А. Пантелеев, А. М. Шибеко, Д. Ю. Нечипуренко, Е. А. Береснева, Н. А. Подоплелова, А. Н. Свешникова	163
Принципы и проблемы выделения экзосом из биологических жидкостей Е. И. Якубович, А. Г. Полищук, В. И. Евтушенко	172

Латеральное взаимодействие цилиндрических трансмембранных пептидов в одномерном приближении	
О. В. Кондрашов, С. А. Акимов	186
Изменения флуоресценции хлоропластов в связи с возбудимостью клеток <i>Chara</i> и переносом метаболитов в потоке цитоплазмы	
А. А. Булычев, А. В. Алова	195
Ингибитор PI3K и mTOR воксталисиб нарушает сопряжение мускаринового рецептора M3 с мобилизацией Ca ²⁺	
О. О. Лямин, П. Д. Котова, Е. А. Дымова, П. Ю. Фадеев, О. А. Рогачевская, Е. А. Воронова, С. С. Колесников	205
N-Концевой фрагмент виментина отвечает за связь с митохондриями <i>in vitro A. А. Даял, Н. В. Медведева, А. А. Минин</i>	215
Использование хинолизидиновых производных кумарина при изучении механизмов действия комплекса цитохрома <i>с</i> с кардиолипином	
Л. А. Ромодин, Н. П. Лысенко, Т. Н. Пашовкин	224
КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ	
Особенности структуры и электрофизиологических свойств нового порина из морской бактерии Marinomonas primoryensis	
Д. К. Чистюлин, Е. А. Зелепуга, В. А. Хоменко, О. Ю. Портнягина, О. Д. Новикова	235
PERSONALIA	

Памяти Владимира Анатольевича Шувалова 13.10.1943-08.01.2022	240

-

-

Vol. 39, No. 3, 2022

REVIEWS

Hemostasis and Thrombosis. Spatial Organization of the Biochemical Processes at Microscale					
M. A. Panteleev, A. M. Shibeko, D. Y. Nechipurenko, E. A. Beresneva, N. A. Podoplelova, A. N. Sveshinkova					
Principles and Problems of Exosome Isolation from Biological Fluids					
E. I. Yakubovich, A. G. Polischouk, V. I. Evtushenko	172				

Lateral Interaction of Cylindrical Transmembrane Peptides in a One-Dimensional Approximation O. V. Kondrashov, S. A. Akimov	186				
Changes of Chloroplast Fluorescence in Relation to Excitability and Metabolite Transport by Cytoplasmic Streaming in <i>Chara</i> Cells <i>A. A. Bulychev, A. V. Alova</i>	195				
PI3K and mTOR Inhibitor Voxtalisib Antagonizes Coupling of M3 Muscarinic Receptor to Ca ²⁺ Mobilization					
O. O. Lyamin, P. D. Kotova, E. A. Dymova, P. Yu. Fadeev, O. A. Rogachevskaja, E. A. Voronova, S. S. Kolesnikov	205				
N-Terminal Fragment of Vimentin Is Responsible for Binding of Mitochondria <i>In Vitro A. A. Dayal, N. V. Medvedeva, A. A. Minin</i>	215				
The Use of Quinolizidine Derivatives of Coumarin in Studies of the Mechanisms of Action of the Cytochrome c – Cardiolipin Complex					
L. A. Romodin, N. P. Lysenko, T. N. Pashovkin	224				
SHORT COMMUNICATIONS					
Features of the Structure and Electrophysiological Properties of a Novel Porin from the Marine Bacterium <i>Marinomonas primoryensis</i>					
D. K. Chistyulin, E. A. Zelepuga, V. A. Khomenko, O. Yu. Portnyagina, O. D. Novikova	235				
PERSONALIA					
In Memory of Vladimir Anatolievich Shuvalov (13.10.1943 – 08.01.2022)	240				

УДК 616-005.1-08

ГЕМОСТАЗ И ТРОМБОЗ. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ НА МИКРОУРОВНЕ

© 2022 г. М. А. Пантелеев^{*a*, *b*, *c*, *, А. М. Шибеко^{*a*, *b*}, Д. Ю. Нечипуренко^{*a*, *b*, *c*}, Е. А. Береснева^{*a*}, Н. А. Подоплелова^{*a*, *b*}, А. Н. Свешникова^{*a*, *b*, *c*}}

^а Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, 109029 Россия

^bНациональный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва, 117198 Россия

^с Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия *e-mail: mapanteleev@yandex.ru Поступила в редакцию 10.12.2021 г. После доработки 20.01.2022 г. Принята к публикации 20.01.2022 г.

Системы свертывания крови и фибринолиза представляют собой ферментативные каскады в плазме крови, управляющие процессами формирования и растворения фибринового сгустка соответственно. Однако критические процессы в обеих системах происходят не в жидкой фазе, а на специализированных "скаффолдах": двух- или трехмерных матрицах, обеспечивающих особые условия для протекания биохимических реакций. В настоящий момент можно выделить следующие принципиальные категории скаффолдов: а) обогащенные фосфатидилсерином фосфолипидные мембраны, предоставляемые прокоагулянтной субпопуляцией активированных тромбоцитов, а также поврежденным эндотелием, мембранами апоптотических телец в атеросклеротической бляшке, липопротеидами и микровезикулами плазмы, б) комплекс фибрина и белков внеклеточного матрикса, ассоциированный с тромбоцитами и являющийся ведущим скаффолдом для про- и анти-фибринолитических процессов, в) полимеры фосфатов, включая тромбоцитарные полифосфаты и внеклеточные ловушки нейтрофилов. Для некоторых из этих скаффолдов существуют предположения об их физиологической значимости и физическом смысле, в то время как роль других представляется загадочной или, как минимум, патофизиологической. Здесь мы рассмотрим существующие представления о ролях и механизмах участия этих скаффолдов в гемостазе и тромбозе.

Ключевые слова: свертывание крови, фибринолиз, мембранные реакции, скаффолды **DOI:** 10.31857/S0233475522030094

введение

Системы свертывания крови и фибринолиза представляют собой характерные примеры ферментативных систем внеклеточной регуляции [1]. В основе и той и другой лежат протеолитические ферменты, активирующие друг друга в каскадах, содержащих многочисленные обратные связи (рис. 1) [2, 3]. Результатом работы каскада свертывания крови является фибриновый сгусток, предотвращающий потерю крови; задачей системы фибринолиза является растворение этого фибрина. Задачи обеих систем являются принципиально пространственными, и сложная структура каскадов свертывания и фибринолиза, повидимому, связана с наличием в них модулей, отвечающих за отдельные функциональные подзадачи [4–6]. Так, положительная обратная связь активации фактора XI тромбином наделяет каскад свертывания автоволновыми свойствами [7], активация фактора свертывания V тромбином и формирование протромбиназы играет определяющую роль в пороге по активации [4, 8], а активация фактора свертывания VII важна для порога по скорости потока и распознавания геометрии места повреждения [8, 9].

На протяжении многих лет признается, что главные реакции каскада свертывания крови идут на поверхности фосфолипидных мембран [10], предположительно предоставляемых в первую очередь прокоагулянтной субпопуляцией активированных тромбоцитов [11]. Это включает активацию фактора X внешней теназой [12] и внутренней теназой [13, 14], активацию протромбина протромбиназой, инактивацию фактора Va активированным протеином С и другие. Точно так же процесс фибринолиза по определению тесно свя-



Рис. 1. Каскады свертывания (а) и фибринолиза (б).

Обозначения: реакции превращения факторов свертывания в активные формы показаны односторонними тонкими черными стрелками. При этом фигурные красные стрелки показывают, под действием каких именно ферментов происходит активация. Реакции потери активности в результате ингибирования показаны тонкими зелеными стрелками (для простоты стрелки изображены как просто "уход", т.е. не показано, с какими именно ингибиторами происходит связывание). Обратимые реакции формирования комплексов показаны двусторонними тонкими черными стрелками. Белки свертывания обозначены либо названиями, либо римскими цифрами, либо аббревиатурами (TF – тканевой фактор, PC – протеин C, APC – активированный протеин C, Pg – плазминоген, Pn – плазмин, FDP – продукты деградации фибрина). Чтобы избежать перегруженности, на схеме не показаны: связывание тромбина с тромбомодулином, активация и секреция тромбоцитов, контактная активация свертывания.

зан с фибрином. В этих областях науки продолжает таиться много загадок — в части механизмов связывания белков свертывания с мембраной [15–17], путей сборки мембранных комплексов и доставки субстрата [12, 13, 18], видов прокоагулянтных поверхностей в организме [11, 19]. Однако исследования последнего десятилетия привели к более масштабному пересмотру картины: как будет описано ниже, взаимодействие белков свертывания и фибринолиза с "нерастворимой фазой" оказалось куда более многообразным и масштабным, чем представлялось еще не так давно [5, 11, 15, 17, 20–28].

В силу этого мы хотели бы предложить более дерзкий пересмотр существующих представлений и обсудить, как выглядят биохимические реакции, проходящие в "нерастворимой фазе", в свете этих открытий. Мы постараемся показать, что в гемостазе и тромбозе можно выделить три блока таких "скаффолдов", имеющих более сложный и гибкий смысл, чем предполагалось ранее. Под скаффолдами здесь и далее мы будем подразумевать двух- и трехмерные молекулярные структуры, служащие плацдармом для разворачивающихся биохимических процессов и управляющие их скоростями.

1. Прокоагулянтные мембраны — ключевой скаффолд для прокоагулянтных реакций свертывания, имеющий, по-видимому, два физических смысла: а) локальное концентрирование белков, позволяющее преодолеть диффузионный предел скорости химической реакции и проводить быстрые реакции при низких концентрациях факторов свертывания, б) управление пространственным распределением факторов свертывания путем создания "неподвижной фазы", где белки защищены от ингибиторов, потока и дополнительно стабилизированы мультимеризацией.

2. Комплекс фибрина и ассоциированных с ним молекул внеклеточного матрикса и адгезионных молекул (фибронектин, тромбоспондин, фактор Виллебранда), который неразрывно связан с тромбоцитарным агрегатом через рецепторы-интегрины тромбоцитов. Этот комплекс влияет на свертывание (через фактор VIII, ассоциированный с фактором Виллебранда; путем прямого влияния на связывание фактора VIII; также путем адсорбции и протекции тромбина), управляет антифибринолитическими реакциями, находящимися между свертыванием и фибринолизом (фактор XIII активируется тромбином в фибрин-зависимых реакциях), является мишенью антифибринолитических модификаций (фактор XIIIa, TAFI), а также служит основой для всего каскада фибринолиза (ускорение активации плазминогена тканевым активатором плазминогена, защита плазмина от сверхбыстрого ингибирования в плазме крови). Сейчас считается, что пространственное распределение фибрина в тромбах далеко не гомогенное [29, 30]. В богатых тромбоцитами тромбах фактор Виллебранда оказывается критически важным элементом архитектуры, берущим на себя механическую функцию и препятствующим фибринолизу [20, 26].

3. Полимеры фосфатов в разном виде, главными из которых являются: а) полифосфаты тромбоцитов, являющиеся важными кандидатами в активаторы контактного пути в артериальном тромбе и модуляцию огромного количества других реакций; б) внеклеточные ловушки нейтрофилов, играющие огромную роль в венозном тромбозе; в) ДНК предположительно лейкоцитарного происхождения (возможно, частично также из внеклеточных ловушек нейтрофилов [22]), стабилизирующая тромбы и препятствующая их лизису [26, 27].

Разберем эти скаффолды и связанные с ними механизмы один за другим. В данном обзоре мы не будем подробно описывать молекулярные и биохимические особенности этих реакций, а сосредоточимся на попытке принципиального понимания их функционирования.

ПРОКОАГУЛЯНТНЫЕ МЕМБРАНЫ: ТРОМБОЦИТЫ И НЕ ТОЛЬКО

Возможная величина константы скорости любой ферментативной реакции ограничена сверху частотой столкновений между молекулами, которая в свою очередь определяется скоростью диффузии. Для белков в воде при комнатной температуре [31] этот диффузионный предел определяет верхнюю границу каталитической эффективности как $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Характерные концентрации ферментов свертывания крови не превышают десятков нМ; для некоторых из них нормой являются концентрации порядка пМ. Если у нас есть фермент с концентрацией 1 пМ (10^{-12} М), то он сможет катализировать лишь 0.1% своего субстрата в секунду. На практике же большинство реальных ферментов имеет константы не больше $10^7 \,\mathrm{M}^{-1} \,\mathrm{c}^{-1}$, и тогда результат оказывается еще более ничтожным. Очевидно, что для системы свертывания, которая отвечает за критические защитные функции, скорость срабатывания в десятки часов неприемлема. С другой стороны, производить заметно более высокие концентрации ферментов, которые имеют лишь сигнальное значение и не производят полезного продукта, кажется невыгодным для организма. Однако если перевести эти многочисленные ферменты в небольшой замкнутый объем или, даже лучше, посадить на небольшую мембрану (рис. 2*a*), то эффективность реакций резко увеличится. Это позволяет предположить, что широкое использование мембранных реакций в свертывании крови, равно как и во внутриклеточной сигнализации, обусловлено потребностью сочетать высокую скорость процессов с низкими концентрациями управляющих ферментов.

Несмотря на то, что эта идея кажется прозрачной и очевидной, проверить ее на практике непросто. Исходная идея регуляторной роли мембраны, ускоряющей свертывание за счет локального концентрирования или "редукции числа измерений", появилась еще в 1980-е и была способна объяснить экспериментальные наблюдения, в том числе такие как увеличение наблюдаемой константы Михаэлиса для протромбиназы при увеличении концентрации липидных везикул [32]. Действительно, если цель мембраны – сконцентрировать факторы, то увеличение площади мембраны ведет к их разбавлению. В согласии с этим, мы сейчас знаем, что лишь часть тромбоцитов переходит в состояние прокоагулянтных для ускорения реакций свертывания [33-39], и возможное объяснение может быть в том, что слишком много тромбоцитов для этого будет вредно (рис. 26). Более того, мы знаем, что белки свертывания на прокоагулянтных тромбоцитах концентрируются в специальной структуре — "шапке" (рис. 2в) [15], что может дополнительно ускорить реакции.

С другой стороны, уже почти 20 лет назад было показано, что растворимый фосфатидилсерин может поддерживать формирование как минимум одного комплекса (протромбиназы) не хуже, чем мембрана [40]. Это не очень хорошо согласуется с идеей "редукции числа измерений" или с идеей преодоления диффузионного барьера. Кроме того, диффузионные ограничения, описанные выше, недостаточно сильные, чтобы ферменты на максимуме возможностей не могли их преодолеть.

Альтернативная гипотеза, которая приходит на ум: мембраны могут быть важны для пространственной организации процесса. Около двадцати лет назад была предложена концепция "клеточной модели гемостаза" [41], которая делала упор на мембранных реакциях как особых компартментах, где белки свертывания защищены от ингибирования. Перемещение между компартментами управляется диффузией (нужно выйти изпод защиты мембраны и продиффундировать к



ДИК

5 мкм



Аннексин V

р-селектин



наложение



в

Рис. 2. *а* – Мембранные реакции, *б* – микрофотография агрегата тромбоцитов, содержащего прокоагулянтные тромбоциты; *в* – микрофотография отдельного прокоагулянтного тромбоцита и его "шапки" в различных каналах [11]; *г* – вытеснение прокоагулянтных тромбоцитов из тромба (слева – комбинированное изображение, полученное методом наложения дифференци-ально-интерференционного контраста (ДИК) и эпифлуоресцентного изображения в канале аннексина V, справа – эпифлуоресцентное изображение в канале аннексина V [29], желтый контур соответствует границе тромба, выделенной в канале ДИК).

соседнему тромбоциту или от поврежденного субэндотелия к тромбоциту), и действительно, в согласии с этим рост сгустка управляется диффузией фактора IXa, который гораздо медленнее ингибируется в плазме, чем фактор Xa [6, 42]. Интересно, что на тромбоцитах, помимо фосфатидилсерина, существуют иные способы связывания факторов свертывания (рецепторы, такие как гликопротеин Ib-V-IX, для тромбина и фактора XI, не имеющих доменов для связывания мембраны, а также возможность связывания фактора VIII тем же гликопротеином Ib-V-IX через фактор фон Виллебранда), которые, судя по всему, не ускоряют реакций с их участием, но защищают от ингибиторов [43].

Наличие связывания с мембраной может также менять наблюдаемые коэффициенты диффузии факторов свертывания в тромбоцитарных агрегатах [44], что может позволить управлять пространственной организацией процесса. Далее, мы знаем, что быстрые потоки могут нарушать работу химических систем, и свертывание крови, в частности, может "выключаться", даже когда скорости потока заметно меньше сосудистых [9]. Тогда "привязка" факторов к мембранам позволит защитить их от потока. В согласии с этим, для ряда факторов сообщается формирование гомо-и гетеродимеров на мембране [16, 45], которые более прочно с ней связаны и защищены от смыва потоком. Еще один возможный аргумент в пользу предположения о роли мембран в пространственной организации тромбов — вытеснение прокоагулянтных тромбоцитов на периферию тромба, где происходит формирование фибринового слоя [29]. Таким образом, локализация фибрина в определенных областях тромба может быть достигнута за счет соотвествующего перераспределения прокоагулянтных мембран. Однако вытеснение прокоагулянтных тромбоцитов на периферию тромбов, их последующее взаимодействие с другими клетками и попадание в кровоток может приводить и к патофизиологическим процессам: так, формирование патологических агрегатов нейтрофилов с прокоагулянтными тромбоцитами и их фрагментами может являться одним из ключевых механизмов тромбирования легких при ишемии кишечника [46].

Необходимо признать, что хотя обе гипотезы о физическом смысле мембранных реакций кажутся интуитивно понятными и подтверждены косвенными наблюдениями, в настоящий момент нет ни прямых доказательств их справедливости, ни четких предсказаний необходимых экспериментов для того, чтобы их проверить.

Дополнительная сложность связана с тем, что источник прокоагулянтной активности в гемостазе и тромбозе не понятен до конца. Хотя прокоагулянтные тромбоциты кажутся подходящими кандидатами на эту роль, вклад непрокоагулянтных тромбоцитов, микровезикул плазмы крови, липопротеинов, эритроцитов, поврежденного эндотелия может быть значительным как в физиологических, так и в патологических условиях [11, 19, 42].

ФИБРИЛЛЯРНЫЕ СКАФФОЛДЫ

Фибрин

Традиционно фибрин рассматривается в первую очередь как пассивная составляющая тромба, хотя его способность влиять на свертывание разными путями известна давно (недаром исторически его называли "антитромбин І" за способность связывать тромбин). Сейчас становится понятно. что фибрин плотно и специфически связывает многочисленные молекулы и клетки, формируя мощную основу для протекания разнообразных биохимических процессов. Особенно ярко это выражается в "шапках" прокоагулянтых тромбоцитов, где сеть фибрина ассоциирует многочисленные молекулы альфа-гранул [47]. Взаимодействие фибрина с фактором Виллебранда и тромбоспондином, взаимодействие тромбоцитов с ними всеми и коллагеном, а также атака системой фибринолиза (и ее продолжением - системой металлопротеиназ матрикса) и фибрина, и коллагена позволяет рассматривать совокупность всех этих молекул как единый скаффолд "фибринвнеклеточный матрикс".

Минимальный список задач для этого скаффолда приведен ниже.

1. Фибрин сорбирует тромбин, который при этом сохраняет часть своей активности даже в иммобилизированном виде. Возможные роли в норме и патологии включают в себя ограничение пространственного распространения тромбина путем защиты от диффузии, а также возможность позднее отсоединиться и проявить свою активность.

2. Фибрин связывает фактор Виллебранда, к которому привязан фактор VIII. Кроме того, фибрин сам формирует эффективные сайты связывания для фактора VIII, которые могут быть важнее для связывания с тромбоцитами, чем фосфатидилсерин [21]. Недавние работы показывают, что фибрин может быть важен для связывания не только этого фактора [28]. В "шапках" прокоагулянтных тромбоцитов этот скаффолд переплетается с фосфатидилсерином и GPIb-ассоциированным фактором Виллебранда, а также тромбоспондином. В богатых тромбоцитами тромбах фактор Виллебранда оказывается критически важным элементом архитектуры, берущим на себя механическую функцию и препятствующим фибринолизу [20, 26].

3. Фибрин контролирует анти- и профибринолитические процессы. Он радикально ускоряет активацию фактора XIII тромбином, активацию плазминогена его тканевым активатором, а также защищает плазмин от быстрой инактивации в плазме (по интересной аналогии с защитой для мембранно-связанных ферментов свертывания).

Таким образом, фибрин можно рассматривать не только как механическую основу тромба и мишень для фибринолиза, но и как одну из "нерастворимых" фаз, контролирующих скорость работы, пространственное распространение и инактивацию ферментов свертывания крови И фибринолиза. Физический и физиологический смысл этого матрикса требует уточнений. Сейчас считается, что пространственное распределение фибрина в тромбах далеко не гомогенное, что открывает возможности для гибкой регуляции [29, 30]. Отметим, что фибрин может также служить механическим барьером как для проникновения в кровь патогенов при ранениях. так и для хемотаксиса иммунных клеток из крови в ткань, что позволяет регулировать локальное воспаление [48].

Коллаген

Среди скаффолдов внеклеточного матрикса, не ассоциированных напрямую с фибрином, стоит отдельно выделить фибриллярный коллаген важнейший участник инициации гемостатического ответа при повреждении сосудистой стенки. После обнажения субэндотелиального матрикса происходит адгезия мультимеров фактора фон Виллебранда к коллагену стенок сосуда, а затем обратимое взаимодействие этих мультимеров с тромбоцитами через рецептор гликопротеин GPIb, необходимое для остановки тромбоцитов [49]. После этого происходит взаимодействие тромбоцитарного рецептора GPVI с коллагеном, активация тромбоцитов и их прочное закрепление на субэндотелии благодаря интегринам (а2β1 и а2bβ3) [50]. Известно, что локальные биомеханические (механическая жесткость субстрата) [51], гемодинамические (скорость сдвига и ее градиент) и биохимические (молекулярный состав области повреждения) [52, 53] параметры определяют не только то, в каких условиях протекают эти этапы, но и доминирующие молекулярные механизмы соответствующих процессов, что, в свою очередь, играет важную роль в дальнейшем росте сгустка [53-55]. Следует отметить, что фибриллярный коллаген также может участвовать в контактном пути свертывания за счет прямой активации XII фактора [56].

Как фибрин, так и фибриллярный коллаген обладают сложной пространственной организацией, и ключевые параметры этих скаффолдов (вязкоэластичные свойства и пространственная ориентация фибрилл) могут играть существенную роль в молекулярных процессах, которые разворачиваются на этих структурах. Следует отметить, что объединение коллагена и фибрина в единый тип фибриллярных скаффолдов в данном разделе не подразумевает их функциональную и пространственную ассоциацию в ходе гемостатического ответа, а выделяет фибриллярные скаффолды в отдельный тип внеклеточных матриц, которые играют важнейшую роль в разворачивании и регуляции процессов гемостаза.

Полифосфаты и ДНК в тромбах

Третий важнейший скаффолд, значимость которого была в полной мере раскрыта в последние десять лет, — это разнообразные полимеры фосфатов.

1. Неорганические полифосфаты плотных гранул тромбоцитов представляют собой плохо растворимые комплексы с кальцием, имеют среднюю длину в 60-100 фосфатных единиц и обладают набором биохимических свойств: они ускоряют активацию фактора V, блокируют работу ингибитора пути тканевого фактора, модулируют структуру сгустка, а также радикально ускоряют активацию фактора XI тромбином [23]. Они также являются кандидатами на роль активатора фактора XII на поверхности тромбоцитов [24], хотя есть данные против этого механизма [57] и предположения, что на самом деле это делают компоненты альфа-гранул [17]. Полифосфаты также замедляют фибринолиз через действие на тромбинактивируемый ингибитор фибринолиза [25].

2. Внеклеточные ловушки нейтрофилов представляют собой комплексы ДНК и гистонов, выбрасываемые нейтрофилами при активации. В частности, в процессе тромбообразования нейтрофилы активируются тромбоцитами через Р-селектин. Далее эти ловушки способны активировать свертывание по контактному пути, рекрутировать тромбоциты, внеклеточные везикулы и фактор фон Виллебранда, выступая как универсальные скаффолды [58]. Они играют важную роль в венозном и артериальном тромбозе; их роль в нормальном гемостазе не ясна.

3. Наконец, анализ тромбов при ишемическом инсульте выявил значительное количество ДНК предположительно лейкоцитарного происхождения; эти ДНК стабилизируют тромбы и препятствуют их лизису [26, 27]. Эти ДНК частично могут быть внеклеточными ловушками нейтрофилов [22].

выводы

Свертывание крови и фибринолиз происходят в нескольких фазах, помимо растворимой. Можно выделить как минимум три пространственно разнесенных матрикса или скаффолда, которые служат основой для связывания белков и реализации определенных процессов в этих системах. Расширение наших знаний об этих процессах и формирование четких теорий, объясняющих разнесение и группирование процессов фибринолиза и свертывания между жидкой фазой плазмы крови и тремя "нерастворимыми" фазами необходимо для принципиального прогресса в нашем понимании гемостаза, тромбоза и регенерации ранений.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа была поддержана грантом Российского научного фонда 20-45-01014.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mann K.G., Orfeo T., Butenas S., Undas A., Brummel-Ziedins K. 2009. Blood coagulation dynamics in haemostasis. *Hämostaseologie*. 29 (1), 7–16.
- Shibeko A.M., Panteleev M.A. 2016. Untangling the complexity of blood coagulation network: Use of computational modelling in pharmacology and diagnostics. *Brief Bioinform.* 17 (3), 429–439.
- Panteleev M.A., Andreeva A.A., Lobanov A.I. 2020. Differential drug target selection in blood coagulation: What can we get from computational systems biology models? *Curr. Pharm. Des.* 26 (18), 2109–2115.
- Panteleev M.A., Balandina A.N., Lipets E.N., Ovanesov M.V., Ataullakhanov F.I. 2010. Task–oriented modular decomposition of biological networks: Trigger mechanism in blood coagulation. *Biophys. J.* 98 (9), 1751–1761.
- Shibeko A.M., Chopard B., Hoekstra A.G., Panteleev M.A. 2020. Redistribution of TPA fluxes in the presence of PAI-1 regulates spatial thrombolysis. *Biophys. J.* 119 (3), 638–651.
- Panteleev M.A., Dashkevich N.M., Ataullakhanov F.I. 2015. Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: Roles of geometry, flow and diffusion. *Thromb. Res.* 136 (4), 699–711.
- Dashkevich N.M., Ovanesov M.V., Balandina A.N., Karamzin S.S., Shestakov P.I., Soshitova N.P., Tokarev A.A., Panteleev M.A., Ataullakhanov F.I. 2012. Thrombin activity propagates in space during blood coagulation as an excitation wave. *Biophys. J.* 103 (10), 2233–2240.
- Balandina A.N., Shibeko A.M., Kireev D.A., Novikova A.A., Shmirev I.I., Panteleev M.A., Ataullakhanov F.I. 2011. Positive feedback loops for factor V and factor VII activation supply sensitivity to local surface tissue factor density during blood coagulation. *Biophys. J.* 101 (8), 1816–1824.

- 9. Shibeko A.M., Lobanova E.S., Panteleev M.A., Ataullakhanov F.I. 2010. Blood flow controls coagulation onset via the positive feedback of factor VII activation by factor Xa. *BMC Syst. Biol.* **4**, 5.
- Mann K.G., Nesheim M.E., Church W.R., Haley P., Krishnaswamy S. 1990. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood.* 76 (1), 1–16.
- Podoplelova N.A., Nechipurenko D.Y., Ignatova A.A., Sveshnikova A.N., Panteleev M.A. 2021. Procoagulant platelets: Mechanisms of generation and action. *Hämo-staseologie*. 41 (2), 146–153.
- Kovalenko T.A., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N. 2017. Substrate delivery mechanism and the role of membrane curvature in factor X activation by extrinsic tenase. J. Theor. Biol. 435, 125–133.
- Panteleev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J., Ataullakhanov F.I., Saenko E.L. 2006. Factor VIIIa regulates substrate delivery to the intrinsic factor X-activating complex. *FEBS J.* 273 (2), 374–387.
- Panteleev M.A., Saenko E.L., Ananyeva N.M., Ataulakhanov F.I. 2004. Kinetics of Factor X activation by the membrane-bound complex of Factor IXa and Factor VIIIa. *Biochem. J.* 381 (Pt 3), 779–794.
- Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kotova Y.N., Eckly A., Receveur N., Nechipurenko D.Y., Obydennyi S.I., Kireev I.I., Gachet C., Ataullakhanov F.I., Mangin P.H., Panteleev M.A. 2016. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood.* 128 (13), 1745– 1755.
- Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kurasawa J.H., Sarafanov A.G., Chambost H., Vasil'ev S.A., Demina I.A., Ataullakhanov F.I., Alessi M.C., Panteleev M.A. 2016. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to procoagulant activated platelets and phospholipids results from multistep association and membrane-dependent multimerization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1858 (6), 1216–1227.
- Zakharova N.V., Artemenko E.O., Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Demina I.A., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. 2015. Platelet surface-associated activation and secretion-mediated inhibition of coagulation factor XII. *PLoS One.* **10** (2), e0116665.
- Terentyeva V.A., Sveshnikova A.N., Panteleev M.A. 2015. Kinetics and mechanisms of surface-dependent coagulation factor XII activation. *J. Theor. Biol.* 382, 235–243.
- Lipets E., Vlasova O., Urnova E., Margolin O., Soloveva A., Ostapushchenko O., Andersen J., Ataullakhanov F., Panteleev M. 2014. Circulating contact-pathway-activating microparticles together with factors IXa and XIa induce spontaneous clotting in plasma of hematology and cardiologic patients. *PLoS One.* 9 (1), e87692.
- Denorme F., Langhauser F., Desender L., Vandenbulcke A., Rottensteiner H., Plaimauer B., Francois O., Andersson T., Deckmyn H., Scheiflinger F., Kleinschnitz C., Vanhoorelbeke K., De Meyer S.F. 2016. ADAMTS13-mediated thrombolysis of t-PA-resistant occlusions in ischemic stroke in mice. *Blood.* 127 (19), 2337–2345.

- Gilbert G.E., Novakovic V.A., Shi J., Rasmussen J., Pipe S.W. 2015. Platelet binding sites for factor VIII in relation to fibrin and phosphatidylserine. *Blood.* 126 (10), 1237–1244.
- Laridan E., Denorme F., Desender L., Francois O., Andersson T., Deckmyn H., Vanhoorelbeke K., De Meyer S.F. 2017. Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi. *Ann. Neurol.* 82 (2), 223–232.
- Morrissey J.H., Choi S.H., Smith S.A. 2012. Polyphosphate: An ancient molecule that links platelets, coagulation, and inflammation. *Blood.* 119 (25), 5972–5979.
- Muller F., Mutch N.J., Schenk W.A., Smith S.A., Esterl L., Spronk H.M., Schmidbauer S., Gahl W.A., Morrissey J.H., Renne T. 2009. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell.* **139** (6), 1143–1156.
- Smith S.A., Mutch N.J., Baskar D., Rohloff P., Docampo R., Morrissey J.H. 2006. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103 (4), 903–908.
- Staessens S., Denorme F., Francois O., Desender L., Dewaele T., Vanacker P., Deckmyn H., Vanhoorelbeke K., Andersson T., De Meyer S.F. 2020. Structural analysis of ischemic stroke thrombi: Histological indications for therapy resistance. *Haematologica*. 105 (2), 498–507.
- Staessens S., Francois O., Desender L., Vanacker P., Dewaele T., Sciot R., Vanhoorelbeke K., Andersson T., De Meyer S.F. 2021. Detailed histological analysis of a thrombectomy-resistant ischemic stroke thrombus: A case report. *Thromb. J.* 19 (1), 11.
- Dohrmann M., Makhoul S., Gross K., Krause M., Pillitteri D., von Auer C., Walter U., Lutz J., Volf I., Kehrel B.E., Jurk K. 2020. CD36-fibrin interaction propagates FXI-dependent thrombin generation of human platelets. *FASEB J.* 34 (7), 9337–9357.
- Nechipurenko D.Y., Receveur N., Yakimenko A.O., Shepelyuk T.O., Yakusheva A.A., Kerimov R.R., Obydennyy S.I., Eckly A., Leon C., Gachet C., Grishchuk E.L., Ataullakhanov F.I., Mangin P.H., Panteleev M.A. 2019. Clot contraction drives the translocation of procoagulant platelets to thrombus surface. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39** (1), 37–47.
- 30. Kovalenko T.A., Giraud M.N., Eckly A., Ribba A.S., Proamer F., Fraboulet S., Podoplelova N.A., Valentin J., Panteleev M.A., Gonelle-Gispert C., Cook S., Lafanechere L., Sveshnikova A.N., Sadoul K. 2021. Asymmetrical forces dictate the distribution and morphology of platelets in blood clots. *Cells.* 10 (3), 584.
- Zhou G.Q., Zhong W.Z. 1982. Diffusion-controlled reactions of enzymes. A comparison between Chou's model and Alberty-Hammes-Eigen's model. *Eur. J. Biochem.* 128 (2–3), 383–387.
- Nesheim M.E., Tracy R.P., Mann K.G. 1984. "Clotspeed," a mathematical simulation of the functional properties of prothrombinase. *J. Biol. Chem.* 259 (3), 1447–1453.
- Obydennyy S.I., Sveshnikova A.N., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. 2016. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *J. Thromb. Haemost.* 14 (9), 1867–1881.

- Panteleev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J., Ataulakhanov F.I., Saenko E.L. 2005. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex. *J. Thromb. Haemost.* 3 (11), 2545–2553.
- Sveshnikova A.N., Ataullakhanov F.I, Panteleev M.A. 2015. Compartmentalized calcium signaling triggers subpopulation formation upon platelet activation through PAR1. *Mol. Biosyst.* **11** (4), 1052–1060.
- 36. Sveshnikova A.N., Balatskiy A.V., Demianova A.S., Shepelyuk T.O., Shakhidzhanov S.S., Balatskaya M.N., Pichugin A.V., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. 2016. Systems biology insights into the meaning of the platelet's dual-receptor thrombin signaling. *J. Thromb. Haemost.* 14 (10), 2045–2057.
- Topalov N.N., Kotova Y.N., Vasil'ev S.A., Panteleev M.A. 2012. Identification of signal transduction pathways involved in the formation of platelet subpopulations upon activation. *Br. J. Haematol.* 157 (1), 105–115.
- Topalov N.N., Yakimenko A.O., Canault M., Artemenko E.O., Zakharova N.V., Abaeva A.A., Loosveld M., Ataullakhanov F.I., Nurden A.T., Alessi M.C., Panteleev M.A. 2012. Two types of procoagulant platelets are formed upon physiological activation and are controlled by integrin alpha(IIb)beta(3). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (10), 2475–2483.
- 39. Yakimenko A.O., Verholomova F.Y., Kotova Y.N., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. 2012. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations. *Biophys. J.* **102** (10), 2261– 2269.
- Majumder R., Weinreb G., Lentz B.R. 2005. Efficient thrombin generation requires molecular phosphatidylserine, not a membrane surface. *Biochemistry*. 44 (51), 16998–17006.
- Hoffman M., Monroe D.M., 3rd. 2001. A cell-based model of hemostasis. *Thromb. Haemost.* 85 (6), 958– 965.
- 42. Panteleev M.A., Ovanesov M.V., Kireev D.A., Shibeko A.M., Sinauridze E.I., Ananyeva N.M., Butylin A.A., Saenko E.L., Ataullakhanov F.I. 2006. Spatial propagation and localization of blood coagulation are regulated by intrinsic and protein C pathways, respectively. *Biophys. J.* **90** (5), 1489–1500.
- Reitsma S.E., Pang J., Raghunathan V., Shatzel J.J., Lorentz C.U., Tucker E.I., Gruber A., Gailani D., Mc-Carty O.J.T., Puy C. 2021. Role of platelets in regulating activated coagulation factor XI activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 320 (3), C365–C374.
- 44. Hathcock J.J., Nemerson Y. 2004. Platelet deposition inhibits tissue factor activity: In vitro clots are impermeable to factor Xa. *Blood*. **104** (1), 123–127.
- 45. Koklic T., Majumder R., Weinreb G.E., Lentz B.R. 2009. Factor XA binding to phosphatidylserine-containing membranes produces an inactive membranebound dimer. *Biophys. J.* **97** (8), 2232–2241.
- 46. Yuan Y., Alwis I., Wu M.C., Kaplan Z., Ashworth K., Bark D., Pham A., Mcfadyen J., Schoenwaelder S.M., Josefsson E.C., Kile B.T. 2017. Neutrophil macroaggregates promote widespread pulmonary thrombosis after gut ischemia. *Sci. Trans. Med.* 9 (409), eaam5861.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 39 № 3 2022

- Abaeva A.A., Canault M., Kotova Y.N., Obydennyy S.I., Yakimenko A.O., Podoplelova N.A., Kolyadko V.N., Chambost H., Mazurov A.V., Ataullakhanov F.I., Nurden A.T., Alessi M.C., Panteleev M.A. 2013. Procoagulant platelets form an alpha-granule protein-covered "cap" on their surface that promotes their attachment to aggregates. J. Biol. Chem. 288 (41), 29621– 29632.
- Kaplan Z.S., Zarpellon A., Alwis I., Yuan Y., Mc-Fadyen J., Ghasemzadeh M., Schoenwaelder S.M., Ruggeri Z.M., Jackson S.P. 2015. Thrombin-dependent intravascular leukocyte trafficking regulated by fibrin and the platelet receptors GPIb and PAR4. *Nat. Commun.* 6, 7835.
- 49. Ruggeri Z.M. 2007. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb. Res.* **120** Suppl 1, S5–9.
- Nieswandt B., Watson S.P. 2003. Platelet-collagen interaction: Is GPVI the central receptor? *Blood*. 102 (2), 449–461.
- Qiu Y., Brown A.C., Myers D.R., Sakurai Y., Mannino R.G., Tran R., Ahn B., Hardy E.T., Kee M.F., Kumar S., Bao G., Barker T.H., Lam W.A. 2014. Platelet mechanosensing of substrate stiffness during clot formation mediates adhesion, spreading, and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111** (40), 14430– 14435.
- Barnes M.J., MacIntyre D.E. 1979. Platelet-reactivity of isolated constituents of the blood vessel wall. *Haemostasis*. 8 (3–5), 158–170.
- 53. Gutierrez E., Petrich B.G., Shattil S.J., Ginsberg M.H., Groisman A., Kasirer-Friede A. 2008. Microfluidic de-

vices for studies of shear-dependent platelet adhesion. *Lab. Chip.* **8** (9), 1486–1495.

- van Geffen J.P., Brouns S.L.N., Batista J., McKinney H., Kempster C., Nagy M., Sivapalaratnam S., Baaten C., Bourry N., Frontini M., Jurk K., Krause M., Pillitteri D., Swieringa F., Verdoold R., Cavill R., Kuijpers M.J.E., Ouwehand W.H., Downes K., Heemskerk J.W.M. 2019. High-throughput elucidation of thrombus formation reveals sources of platelet function variability. *Haematologica*. **104** (6), 1256–1267.
- Welsh J.D., Poventud-Fuentes I., Sampietro S., Diamond S.L., Stalker T.J., Brass L.F. 2017. Hierarchical organization of the hemostatic response to penetrating injuries in the mouse macrovasculature. *J. Thromb. Haemost.* 15 (3), 526–537.
- van der Meijden P.E., Munnix I.C., Auger J.M., Govers-Riemslag J.W., Cosemans J.M., Kuijpers M.J., Spronk H.M., Watson S.P., Renne T., Heemskerk J.W. 2009. Dual role of collagen in factor XII-dependent thrombus formation. *Blood.* **114** (4), 881–890.
- Faxalv L., Boknas N., Strom J.O., Tengvall P., Theodorsson E., Ramstrom S., Lindahl T.L. 2013. Putting polyphosphates to the test: Evidence against plateletinduced activation of factor XII. *Blood.* 122 (23), 3818– 3824.
- 58. Thalin C., Hisada Y., Lundstrom S., Mackman N., Wallen H. 2019. Neutrophil extracellular traps: Villains and targets in arterial, venous, and cancer-associated thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39** (9), 1724–1738.

Hemostasis and Thrombosis. Spatial Organization of the Biochemical Processes at Microscale

M. A. Panteleev^{1, 2, 3, *}, A. M. Shibeko^{1, 2}, D. Y. Nechipurenko^{1, 2, 3}, E. A. Beresneva¹, N. A. Podoplelova^{1, 2}, A. N. Sveshinkova^{1, 2, 3}

¹Center for Theoretical Problems of Physico-chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 109029 Russia

²Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, 117198 Russia

³Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: mapanteleev@yandex.ru

Blood coagulation and fibrinolysis systems are enzymatic cascades in blood plasma that control the formation and dissolution of a fibrin clot, respectively. However, critical processes in both systems occur on specialized scaffolds but not in the liquid phase. These scaffolds are two- or three-dimensional matrices that provide special conditions for biochemical reactions. The following fundamental categories of scaffolds can be distinguished: (a) phospholipid membranes enriched with phosphatidylserine provided by a procoagulant subpopulation of activated platelets, as well as damaged endothelium; membranes of apoptotic bodies in atherosclerotic plaque; lipoproteins, and plasma microvesicles; (b) complex of fibrin and extracellular matrix proteins, which is associated with platelets and is the leading scaffold for pro- and anti-fibrinolytic processes; (c) polymers containing phosphate groups, including platelet polyphosphates and neutrophil extracellular traps. For some of these scaffolds, there are speculations about their physiological significance and physical meaning, while the role of others seems mysterious or at least pathophysiological. Herein we consider existing ideas about the roles and mechanisms of the involvement of these scaffolds in hemostasis and thrombosis.

Keywords: blood coagulation, fibrinolysis, membrane reactions, scaffolds

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 39 № 3 2022

———— ОБЗОРЫ ——

УДК 576.54

ПРИНЦИПЫ И ПРОБЛЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

© 2022 г. Е. И. Якубович^{а, *}, А. Г. Полищук^а, В. И. Евтушенко^а

^а Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. академика А. М. Гранова Минздрава России, Санкт-Петербург, 197758 Россия

*e-mail: jakubovichelena@mail.ru Поступила в редакцию 14.01.2022 г. После доработки 20.01.2022 г. Принята к публикации 21.01.2022 г.

Экзосомы, подкласс малых мембранных внеклеточных везикул, имеют большой диагностический и терапевтический потенциал, однако отсутствие стандартизированных методов их эффективного выделения и анализа ограничивает внедрение экзосомальных технологий в клиническую практику. В представленном обзоре рассматриваются проблемы, связанные с выделением экзосом из биологических жидкостей, и принципы традиционных и альтернативных методов выделения. Цель представленного обзора — проиллюстрировать разнообразие подходов, основанных на физических и биохимических свойствах экзосом, которые могут быть использованы для выделения экзосом. Обсуждаются достоинства и недостатки разных методов.

Ключевые слова: микровезикулы, экзосомы, биосепарация, методы выделения **DOI:** 10.31857/S0233475522030100

введение

Сегодня экзосомы стали одним из популярных объектов научных исследований, что связано с их уникальными природными свойствами, которые могут быть использованы в клинических целях. Экзосомы – специфический подкласс внеклеточных везикул (BB) размером 50–100 нм, естественным образом секретируемых большинством эукариотических клеток. Эндосомальный биогенез отличает их от других типов BB (апоптотических телец и микровезикул) [1]. Они формируются в эндосомах путем инвагинации эндосомальной мембраны, после чего выбрасываются во внеклеточное пространство в результате слияния образованных мультивезикулярных телец с плазматической мембраной клетки [1].

Эти нановезикулы окружены билипидной мембраной, на поверхности которой присутствуют тетраспанины CD9, CD63, CD81 и CD83, которые сегодня традиционно используются в качестве экзосомальных маркеров [2]. Их внутреннее содержимое включает различные клеточно-специфичные белки, липиды, метаболиты и нуклеиновые кислоты (ДНК, мРНК, микроРНК, длинные некодирующие РНК), спектр которых отчасти может отражать фенотип клетки-продуцента. Экзосомы участвуют в межклеточной коммуникации, транспортируя свое содержимое к клеткам-реципиентам и инициируя в них различные эффекты. Клетки-реципиенты могут находиться как рядом, так и на значительном удалении от места секреции [3]. Доставка содержимого от клеток-продуцентов экзосом к клеткам-реципиентам происходит адресно и без потерь [4]. Показано, что экзосомы вовлечены в широкий спектр физиологических и патологических процессов: эмбриональное развитие, иммунные реакции, регенерацию тканей, регуляцию сосудистого гомеостаза, развитие различных заболеваний, в том числе онкологических [5-8]. Поскольку экзосомы обнаруживаются во многих биологических жидкостях организма, то количественный и качественный анализ циркулирующих экзосом может быть перспективным инструментом малоинвазивной диагностики заболеваний, мониторинга эффективности лечения и доклинического выявления рецидивов. В настоящее время активно исследуются диагностические возможности протеомного анализа и профилирования микроРНК экзосом, выделенных из плазмы, мочи, слюны и других жидкостей пациентов с разными заболеваниями [9-12]. Другим направлением исследований клинического потенциала экзосом является терапевтическое. Такие природные свойства экзосом, как малый размер, стабильность в кровеносном русле, низкая иммуногенность, способность селективно транспортировать на большие расстояния свое содержимое в клетки-реципиенты, а также возможность модификации их поверхности и содержимого, определяют перспективность использования этих нановезикул для адресной доставки лекарственных препаратов [13–15], создания вакцин [16, 17], развития новых технологий в регенеративной медицине [9, 18].

Ключевой предпосылкой для внедрения экзосомальных технологий в клиническую практику является разработка эффективных и стандартизированных методов выделения, позволяющих получать чистые и однородные препараты экзосом в достаточном количестве. Однако до сих пор таких методов нет. Все наиболее широко используемые сегодня подходы основаны на известных физических (размер, форма, плотность, заряд) или химических (состав поверхности мембраны) свойствах везикул. За последние годы выполнено огромное число исследований, задачей которых был сравнительный анализ разных методов и их комбинаций для выделения экзосом из разных биологических жидкостей [19-23]. Эти работы показали, что препараты экзосом, выделенные из одного и того же биоматериала разными методами, могут значительно различаться как по выходу и чистоте, так и по физическим характеристикам нановезикул (морфологии, размеру) и их биохимическому составу (уровню поверхностных маркеров, спектру микроРНК и белков). С другой стороны, тип биологической жидкости также влияет на конечный результат. Например, Langevin и соавторы сравнили нановезикулы, выделенные методом ультрацентрифугирования, из слюны, сыворотки и мочи здоровых доноров, и показали, что они отличаются по профилю некодирующих РНК [21]. До сих пор нет ясности, какой протокол выделения может быть оптимальным в каждом конкретном случае, в зависимости от типа биологической жидкости и конечной цели исследования. Учитывая актуальность проблемы, работы по разработке новых технологий и протоколов выделения экзосом из разных биологических жидкостей продолжаются.

В представленном обзоре рассмотрены различные методы выделения экзосом из биологических жидкостей как традиционные (ультрацентрифугирование, фильтрация, гель-хроматография, преципитация полимерами, иммуноаффинная сепарация), так и относительно новые: разделение в двухфазной системе, анион-обменное разделение, олиго-фосфатная агрегация (SubX-Matrix technology), преципитация альгиновыми кислотами, метод твердофазного связывания с карбидом кремния. Описаны принципы этих методов, их преимущества и недостатки.

ОСНОВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ ЭКЗОСОМ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

Высокая комплексность биологических жидкостей и отсутствие уникальных маркеров экзосом с высоким уровнем экспрессии, позволяющих дифференцировать их от других подтипов ВВ, значительно усложняют задачу получения чистой фракции экзосом без сушественных потерь. В любой биологической жидкости, помимо экзосом, циркулируют и другие близкие по размеру, массе и плотности к экзосомам компоненты: белки, липопротеины различной плотности, нуклеопротеиновые комплексы, мембранные везикулы других типов и др. Эти биологически активные частицы, так же как и экзосомы, могут содержать микроРНК или сигнальные белки и липиды. При этом сам пул экзосом также довольно гетерогенный [24]. Он состоит из субпопуляций нановезикул, которые отличаются по размеру, морфологии, поверхностным маркерам, биохимическому содержанию. Контаминация препаратов экзосом неэкзосомальными компонентами биологической жидкости может приводить к искажениям в количественных оценках содержимого экзосом [25]. С другой стороны, в процессе выделения часть экзосом может разрушаться или теряться, например, из-за агрегации нановезикул или низкого уровня экспрессии мембранных маркеров, что также будет искажать результаты.

Спектр контаминирующих компонентов может меняться в зависимости от источника экзосом. Так, например, основным загрязняющим компонентом при выделении из крови могут быть липопротеины и альбумин, которые присутствуют в крови в значительном количестве. Концентрация липопротеинов в сыворотке значительно превосходит концентрацию циркулирующих внеклеточных везикул (10¹² против 10⁷-10⁹ частиц/мл) [26]. При этом сепарировать экзосомы от липопротеинов чрезвычайно сложно из-за близости их размеров и плотностей. Основной проблемой при выделении из мочи является уромодулин (белок Tamm-Horsfall), концентрация которого может достигать 1.5 мг/мл. Полимерная сеть, формируемая этим белком, может связывать экзосомы, снижая эффективность выделения [27].

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ

Ультрацентрифугирование

Чаще всего в экспериментальных исследованиях экзосомы выделяют методом ультрацентрифугирования — разделения веществ под действием центробежной силы. Метод основан на разной скорости оседания частиц, отличающихся по размеру и плотности. Выделяют три варианта метода, основанных на центрифугировании: дифференциальное центрифугирование, зонально-скоростное градиентное центрифугирование и изопикническое градиентное центрифугирование.

Дифференциальное ультрацентрифугирование (или центрифугирование с дифференциальной скоростью) - самый оптимальный метод выделения экзосом, и в настоящее время он считается "золотым стандартом", относительно которого оценивают эффективность других методов выделения. Эта техника включает обычно несколько последовательных раундов центрифугирования с увеличивающимися центробежной силой и временем центрифугирования, что позволяет раздельно осаждать частицы, отличающиеся по размеру и плотности. После каждого раунда отбирается супернатант, который подвергается дальнейшему центрифугированию. Хотя используемые в настоящее время протоколы выделения экзосом могут отличаться, большинство из них включает четыре этапа центрифугирования: на первых двух этапах (10 мин при 300 g и далее 10 мин при 2000 g) осаждаются клетки, клеточный "дебрис" и крупные везикулы. На третьем этапе (30 мин при 10000 g) экзосомы отделяются от везикул неэкзосомального происхождения, размер которых обычно превышает 100-150 нм. Экзосомы осаждаются на последнем этапе путем центрифугирования при ускорении 100000-150000 g в течение 1-6 ч. В качестве преимуществ этого метода можно назвать возможность выделения экзосом из большого количества биоматериала, относительно невысокую стоимость и отсутствие дополнительных химических реагентов для проведения процедуры, которые могли бы загрязнить препарат экзосом. С другой стороны, для экстракции экзосом из небольших количеств биоматериала этот метод не пригоден. Недостатком метода является трудоемкость, необходимость специального оборудования, зависимость эффективности разделения от типа ротора (угловой или бакет-ротор) и его специфических параметров (максимальный и минимальный радиус ротора, длина седиментационного пути), температуры и вязкости исходной жидкости, что требует индивидуальной корректировки стандартных протоколов центрифугирования в зависимости от используемого ротора и свойств разделяемой биожидкости [28]. Значительным недостатком является также присутствие в осадке экзосом примесей неэкзосомального происхождения. Метод дифференциального центрифугирования позволяет эффективно разделять только фракции частиц. которые значительно отличаются по скорости седиментации. Высокая гетерогенность состава биологической жидкости (включая и пул экзосом), содержащей компоненты с близкой плотностью и размером, приводит к тому, что часть экзосом седиментирует на более ранних этапах центрифугирования вместе с более крупными частицами, в то время как другая не осаждается даже после центрифугирования при больших g, в результате чего часть экзосом теряется. С другой стороны, вместе с экзосомальной фракцией соосаждаются неэкзосомальные компоненты, присутствующие в биологической жидкости, такие как липопротеины, агрегаты белков, нановезикулы других типов. Согласно исследованиям Kowal J. с соавторами, 70% фракции экзосом, выделенной этим методом, составляют частицы размером 50-150 нм, 20% - частицы размером более 150 нм и 10% – менее 50 нм [29]. Комбинация ультрацентрифугирования с дополнительными ступенями очистки (отмывка осадка большими объемами буфера с последующим ре-центрифугированием, ультрафильтрация суспензии экзосом) позволяют дополнительно очистить фракцию экзосом, но ценой потери их количества. К недостаткам метода относится и возможность деформации экзосом во время центрифугирования, что может изменить их морфологию и функциональные свойства.

Более "чистые" экзосомы могут быть выделены методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности. Это модифицированная версия дифференциального центрифугирования. В отличие от дифференциального центрифугирования, центрифугирование в градиенте плотности позволяет разделить близкие по размеру или плотности частицы многокомпонентной пробы. Выделяют два типа ультрацентрифугирования в градиенте плотности: зонально-скоростное и изопикническое ультрацентрифугирование.

При зонально-скоростном центрифугировании частицы разделяются по скорости их седиментации, которая зависит от размера частицы. В отличие от дифференциального центрифугирования, этот метод разделяет частицы разного размера одновременно при одном центрифугировании. Пробу тонким слоем наносят поверх буферного раствора с преформированным градиентом концентрации, постепенно уменьшающейся по направлению от дна пробирки к мениску, и центрифугируют. Под действием центробежной силы частицы перемещаются по раствору, так как их плотность больше плотности раствора, при этом скорость перемещения по градиенту зависит от размера частицы. В результате частицы близкого размера формируют в пробирке дискретные зоны. Градиент плотности повышает эффективность разделения, препятствуя преждевременному осаждению частиц, а также смешиванию зон в результате конвекции жидкости. Центрифугирование ведут до достижения оптимального распределения зон в пробирке, после чего фракции собирают. Поскольку максимальная плотность градиентного буфера меньше плотности частиц в пробе, то при очень длительном центрифугировании все компоненты, включая экзосомы, могут осесть на дне пробирки, поэтому требуется оптимизация длительности центрифугирования.

Изопикническое градиентное центрифугирование используется для разделения частиц, различающихся по плавучей плотности, и основано на том, что частицы в средах со схожей плавучей плотностью остаются неподвижными. В данном варианте образец наносят на поверхность градиента концентрации буфера, перекрывающего диапазон плотностей всех компонентов пробы. В процессе центрифугирования частицы движутся через градиент буфера, пока не достигнут положения, в котором их плавучая плотность совпадет с плотностью буфера. Частицы остаются в этом конечном положении даже после остановки ротора. Поскольку максимальная плотность градиента выше плотности пробы, то частицы не достигают дна даже при длительном центрифугировании.

Экзосомы чаще всего выделяют в сахарозном градиенте (2.0-0.25 М). Проба наслаивается на градиент и центрифугируется при 210000 g 16 ч. В процессе центрифугирования все компоненты, включая экзосомы, апоптотические тельца, белковые агрегаты, движутся в градиенте, пока не достигнут зоны с плотностью, соответствующей их плавучей плотности. Экзосомы концентрируются в зоне, соответствующей их плавучей плотности (1.10-1.18 г/мл), а белковые агрегаты и нуклеопротеиновые комплексы, плавучая плотность которых больше, собираются ближе ко дну пробирки [30]. Сахарозный градиент позволяет увеличить концентрацию выделяемых экзосом более, чем в 3 раза по сравнению с обычным центрифугированием [31]. Для очистки экзосом от везикул и комплексов с близкой плавучей плотностью предложена методика с использованием "подушки" сахарозы, сформированной из двух слоев сахарозы разной концентрации: 1 и 2 М [32]. В процессе центрифугирования частицы распределяются по слоям в зависимости от их размера: большие везикулы и агрегаты концентрируются в 2 M слое сахарозы, экзосомы – в 1 M, а легкие молекулы остаются в верхних слоях. По данным ряда исследований, использование 5-40% градиента концентрации йодиксанола вместо сахарозы позволяет повысить чистоту выделяемых экзосом [33]. По сравнению с сахарозой йодиксанол (коммерческое название Opti-Prep) более стабилен и менее вязок [34]. Кроме того, градиент йодиксанола изотоничен при всех используемых концентрациях, поэтому везикулы при движении в градиенте плотности сохраняют форму и размер, что значительно увеличивает эффективность разделения [35]. Показано, что центрифугирование в градиенте плотности йодиксанола эффективно сепарирует экзосомы от вирусных частиц и апоптотических телец [36]. Этот метод позволяет эффективно отделить экзосомы

от близких к ним по размеру липопротеинов, таких как хиломикроны, липопротеины очень низкой, промежуточной и низкой плотности, поскольку их плавучая плотность намного ниже (<1.063 г/мл). Липопротеины высокой плотности намного меньше по размеру, чем экзосомы, но имеют плавучую плотность, близкую к экзосомам (1.06–1.21 г/мл), поэтому для очистки экзосом от этих молекул нужно использовать методы, разделяющие по размеру [19]. Таким образом, центрифугирование в градиенте плотности позволяет получить более чистые препараты экзосом, однако этот метод также довольно низкопродуктивный и времязатратный, что ограничивает его использование в исследованиях.

Ультрафильтрация

Метод ультрафильтрации также основан на разделении частиц по размеру. В основе метода лежит процедура фильтрации жидкости через фильтр с порами определенного размера. Протоколы выделения экзосом включают несколько последовательных этапов фильтрации через фильтры с порами диаметром 0.8, 0.45, 0.22, иногда и 0.1 мкм, в результате чего из фильтруемой жидкости постепенно удаляются частицы, размер которых больше размера пор. Чаще всего используются коммерческие фильтры из гидрофильных полимеров с низкой аффинностью к белкам, такие как VVLP-фильтр фирмы Millipore из поливинилиденфторида с размером пор 0.1 мкм [37]. По данным ряда работ, сравнивающих разные методы выделения экзосом по таким параметрам, как морфология частиц, их число, загрязнение неэкзосомальными белками, представленность экзосомальных маркеров, методом ультрафильтрации возможно получить экзосомы, сравнимые с экзосомами, выделенными ультрацентрифугированием [38–40]. Преимуществом метода ультрафильтрации является простота процедуры, не требующая специального оборудования и квалификации, скорость очистки, что позволяет за короткий срок выполнить очистку большого количества образцов, и отсутствие дополнительных реагентов, примеси которых могли бы контаминировать экзосомы. К недостаткам методики следует отнести возможность деформации экзосом и загрязнение компонентами жидкости, размер которых меньше размера пор фильтра. Кроме того, часть экзосомальных везикул может абсорбироваться на мембране, в результате чего часть экзосом теряется, что существенно при выделении из малых объемов жидкостей [41]. Засорение пор фильтра белками и другими биополимерными молекулами в процессе фильтрации, вызванное постепенным концентрированием контаминирующих молекул, может снижать скорость очистки и также приводить к потере части экзосом. Texнология ультрафильтрации используется в коммерческих наборах для выделения экзосом ExoMirTMKit (Bioo Scientific).

Метод гель-фильтрации

Метод гель-фильтрации, или эксклюзионной хроматографии, разделяет частицы или молекулы по гидродинамическому радиусу за счет их разной способности проникать в поры геля неподвижной фазы. Этот метод был эффективно адаптирован для выделения экзосом из разных типов жидкостей [42]. Метод позволяет отделить маленькие везикулы от больших, а также от несвязанных с экзосомами растворимых белков и липопротеинов высокой плотности, поскольку они меньше, чем экзосомы. Наиболее часто в качестве неподвижной фазы используют сшитую агарозу (Sepharose (CL-2В и CL-4В) и Sephacryl S-400). По сравнению с другими методами, экзосомы, выделенные гель-фильтрацией, менее всего контаминированы белками плазмы [43]. При этом, как показано в ряде работ, степень очистки экзосом от белковых примесей зависит от используемого полимера и длины колонки [44, 45]. Следует отметить, что разделить везикулы близкого размера, но разного типа, а также отделить экзосомы от других биомолекул близкого размера, методом гель-фильтрации практически невозможно. Поэтому экзосомальная фракция часто загрязнена мелкими не экзосомальными везикулами, крупными белковыми агрегатами и липопротеинами, такими как хиломикроны, липопротеины низкой и очень низкой плотности [19]. Недостатком метода является и низкий выход целевого продукта, который к тому же разбавлен. Тем не менее, несмотря на ряд недостатков, связанных с контаминацией и потерями, метод гельфильтрациии имеет значительные преимущества перед другими методами, особенно в контексте их терапевтического и диагностического использования, и рассматривается некоторыми авторами как наиболее оптимальный метод выделения [42]. Поскольку в процессе разделения частицы движутся в потоке жидкости (чаще всего это фосфатный буфер с рН 7.4) только под действием силы тяжести, то экзосомы сохраняют целостность и функциональную активность [46]. В процессе разделения не используются никакие дополнительные химические реагенты, поэтому дополнительная очистка, как, например, при ПЭГ-преципитации, не требуется.

Сегодня на рынке представлено несколько наборов, использующих технологию гель-фильтрации для выделения экзосом, например, Smart-SECTM Single for EV Isolation (System Biosciences), qEV (Izon Science), PURE-EVs (Hansa Biomed). С целью увеличить выход продукта и его чистоту, компания Cell Guidance Systems разработала комбинированный набор Exo-spinTM, сочетающий ПЭГ-преципитацию с последующей очисткой методом гель-фильтрации.

Методы преципитации

Метод преципитации основан на агрегации экзосом в присутствии преципитирующих агентов. Процедура сводится к смешиванию образца с преципитирующим агентом, инкубации и осаждению образовавшихся агрегатов везикул низкоскоростным центрифугированием (1500 g), после чего осадок растворяется в буфере в объеме, меньше исходного, и используется для дальнейшего анализа.

ПЭГ-преципитация. Наиболее популярным преципитирующим агентом является сильногидрофильный полимер полиэтиленгликоль (ПЭГ). Он давно используется для осаждения вирусных частиц. нуклеиновых кислот и других биомолекул. Экспериментально установленный феномен преципитации в присутствии ПЭГ пока мало изучен. Наиболее популярными теоретическими моделями, описывающими этот процесс, являются теория исключенного объема и теория эффективной силы притяжения, обусловленной исключенным объемом [47]. Согласно модели исключенного объема, преципитация молекул происходит в результате уменьшения их гидратации в присутствии полимера [48]. Вторая модель объясняет преципитацию эффектом притяжения молекул, вызванного осмотическим давлением раствора полиэтиленгликоля [49]. Преимуществами этого метода являются простота и скорость, что позволяет одновременно анализировать несколько проб, а также минимальные потери в процессе выделения. В настоящее время по частоте использования ПЭГ-преципитация уступает только ультрацентрифугированию. Обычно для выделения экзосом используется 8-12% ПЭГ 6 кДа и 8-10% ПЭГ 8 кДа [50, 51]. Среди достоинств можно выделить также то, что в отличие от ультрацентрифугирования и ультрафильтрации, во время которых везикулы могут деформироваться, метод преципитации позволяет получить морфологически и функционально качественные экзосомы. Главным недостатком метода является низкая "чистота" экзосомального препарата. Этот метод только концентрирует экзосомальную фракцию, но не разделяет от других компонентов пробы. Поскольку ПЭГ не специфично осаждает экзосомы, то осадок экзосом содержит свободные белки, такие как липопротеины, иммуногобулины, а также вирусные и другие частицы [52]. Примеси полиэтиленгликоля в целевом продукте, а также плохая растворимость осажденных агрегатов также ограничивают дальнейший анализ и использование выделенных экзосом.

Технология преципитации с использованием ПЭГ лежит в основе ряда коммерческих наборов для выделения экзосом: Total Exosome Isolation Kit (Invitrogen), ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution (System Biosciences), miRCURY Exosome Kits (QIAGEN), Exo-Prep (HansaBioMed), PureExo Exosome Isolation kit (101Bio), ExoGAG (Nasasbiotech), Exosome Precipitation Solutions (Immunostep), miRCURY Exosome Isolation Kit (Exigon). Существенным недостатком коммерческих наборов является их высокая стоимость, значительный уровень контаминации экзосом неэкзосомальными компонентами, ограничения по масштабируемости. Между тем, в ряде работ показано, что оптимизация стандартного протокола ПЭГ-преципитации (например, использование ПЭГ разной молекулярной массы и концентрации, дополнения протокола дополнительными отмывками и инкубациями) позволяет выделить экзосомы даже более эффективно, чем с использованием коммерческих наборов, при этом гораздо дешевле [51–54]. Кроме того, метод может быть успешно использован для выделения из больших объемов биожидкости [50].

Вариант оптимизации метода ПЭГ-преципитации, позволяющий получить более "чистые" препараты экзосом, описан в работе [55]. Авторы предложили перед добавлением ПЭГ обогатить пробу мембранными везикулами. Для этого в предварительно очищенный от клеточных остатков центрифугированием супернатант добавляется мембранотропный/бифункциональный агент Dextran Blue (2000 кДа), который инициирует агрегацию преимущественно мембранных частиц, оставляя немембранные органоиды, большие биополимеры и супрамолекулярные комплексы в растворе. Далее добавляется ПЭГ (20 кДа) и экзосомы осаждаются низкоскоростным центрифугированием. Поскольку используемые концентрации Dextran Blue и ПЭГ достаточно маленькие, то полученные препараты экзосом не содержат преципитирующих полимеров, которые бы мешали дальнейшему анализу.

MGP-преципитация (Mannuronate-Guluronate Polymer-precipitation). Альтернативная технология, также основанная на полимерном осаждении экзосом, описана в работе [56]. В отличие от методов преципитации с образованием агрегатов, в основе этого метода лежит "захват" экзосом порами альгинатного гидрогеля, сформированного из гомополимерных и гетерополимерных остатков маннуроновой и гулуроновой кислот в присутствии ионов кальция [57]. Этот метод включает три основных этапа: смешивание полимера с образцом, кратковременная инкубация смеси при комнатной температуре и осаждение экзосом низкоскоростным центрифугированием. В сравнении с ПЭГ-преципитацией, экзосомы, выделенные MGP-методом, менее загрязнены белками плазмы, но сильнее контаминированы везикулами большого размера.

Заряд-зависимая преципитация

Все внеклеточные везикулы в физиологических условиях отрицательно заряжены. На основе этого свойства везикул были разработаны так называемые "charge-base" (заряд-зависимые) методы преципитации. Экспериментально было показано, что агрегация экзосом может быть стимулирована добавлением положительно заряженных молекул протамина [58]. Аналогичный эффект может вызвать и ацетат натрия [59]. Авторы полагают, что ацетат натрия нарушает гидратную оболочку экзосом и нейтрализует их отрицательный заряд, что приводит к агрегации везикул за счет усиления гидрофобного взаимодействия.

Аффинное взаимодействие

Эта группа методов основана на способности различных биомолекул, присутствующих на поверхности везикул (липидов, полисахаридов, протеинов), к аффинному взаимодействию с другими молекулами, включая антитела, лектины и липид-связывающие протеины.

Связывание мембранных белков. На поверхности экзосомальных мембран экспонированы различные белки, включая тетраспанины CD9, CD63, CD81, CD82, белки теплового шока Hsp70 и Hsp90, антигены главного комплекса гистосовместимости (HLA-антигены) и др. Антитела к этим белкам используются как для анализа экзосомальной фракции, так и для иммунопреципитации экзосом. Для иммунопреципитации обычно используют антитела, конъюгированные с твердофазным носителем (латекс, силикон), который может быть в виде магнитных частиц, покрытых полимером (Dynabeads Magnetic Beads, Thermo Fisher Scientific), колонки для центрифугирования (ExoTrap Exosome Isolation Spin Column, CosmoBio), модифицированных наконечников для пипеток (MSIATMD.A.R.T.'S, Thermo Fisher Scientific) и др. Взаимодействие между антителом, иммобилизованным на поверхности матрикса, и мембраной экзосом относительно сильное, что позволяет отмыть связанные экзосомы от многочисленных компонентов биологической жидкости. Разнообразие используемых антител и носителей в разных форматах объясняет наличие большого количества используемых протоколов, основанных на аффинном взаимодействии. Например, в работе Clayton с соавторами экзосомы, секретируемые В-лимфоцитами, выделялись из кондиционной среды с помощью магнитной сепарации, используя магнитные частицы с конъюгированными HLA-антителами (DP, DQ и DR) [60]. Магнитные частицы инкубировали с кондиционной средой в течение 24 ч, после чего собирали их с помощью магнита и отмывали. Выделенные частицы характеризовали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и проточной цитометрии. 70% выделенных везикул имели средний размер около 70 нм, и 30% — больше 100 нм. Другая исследовательская группа перед магнитной сепарацией экзосом из различных клеточных линий сначала сконцентрировала везикулы из кондиционной среды с помощью гидрофильного полимера, используя набор Total Exosome Isolation Reagent (Invitrogen) [61]. После инкубации с реагентом в течение 12 ч и центрифугирования осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере. Экзосомы из обогашенного препарата были выделены с помошью магнитных частиц, конъюгированных с антителами к CD9, CD63 и CD81. Анализ методами трансмиссионной микроскопии, проточной цитометрии и Western-блота показал, что выделенный препарат содержал везикулы одинакового или близкого размера, с однообразной морфологией и не содержал примесей белков и белковых агрегатов.

В ряде работ предпринята попытка автоматизировать выделение экзосом на основе технологии аффинного связывания с целью ускорить процесс их анализа. Так, Ueda K. с соавторами предложили использовать для этих целей мультиканальную платформу с наконечниками MSIA D.A.R.T.'S, Protein G tips (Thermo Fisher Scientific) [62]. Эти наконечники изначально были разработаны для автоматического быстрого выделения антител с последующим их масс-спектрометрическим анализом. Наконечники содержат матрикс из пористого силикагеля, который ковалентно связан с рекомбинантным G-белком, утратившим, в отличие от нативного белка, способность к взаимодействию с альбумином Такой матрикс при выделении из плазмы не связывает альбумин, что увеличивает эффективность обнаружения минорных фракций специфических белков. Для специфического "захвата" экзосом на силикагеле дополнительно были иммобилизованы антитела к CD9. Сыворотка в объеме 300 мкл вносилась в наконечник, после чего связанные везикулы отмывали и элюировали из матрикса. Время одновременного выделения везикул из 12 образцов занимает всего 30 мин.

Основным преимуществом метода аффинного связывания является чистота препарата, которая обеспечивается специфичностью антиген-антительного связывания. Эта же специфичность является одновременно и минусом метода, поскольку она способствует обогащению конечного продукта экзосомами с высоким уровнем определенного поверхностного маркера и потере экзосом с низким уровнем его экспрессии. Недостатком метода являются ограничения, связанные с доступностью антител, а также сложности отделения экзосом от связавшихся антител.

Аптамеры. Альтернативой антителам при аффинном связывании могут быть аптамеры – короткие искусственные одноцепочечные олигонуклеотиды, которые способны высокоспецифично узнавать определенные молекулы-мишени за счет формирования уникальной трехмерной структуры. Преимуществами аптамеров перед антителами являются возможность отбора аптамеров практически для любой мишени и возможность их химической модификации, что позволяет получить аптамер с желательными свойствами. Аптамеры дешевле антител, имеют длительный срок хранения, сохраняют устойчивость в широком диапазоне условий.

Выделение экзосом на основе аффинного взаимодействия ДНК-аптамеров с поверхностным экзосомальным маркером CD63 описаны в работах [63–65]. Zhang с соавторами использовали CD63-апатамер, модифицированный биотином, который был иммобилизован на магнитных частицах, покрытых стрептавидином [63]. Полученный комплекс инкубировали с плазмой, после чего связавшиеся с магнитным комплексом экзосомы собирали с помощью магнита. Для освобождения экзосом из комплекса авторы добавляли комплементарную аптамеру нуклеотидную последовательность. В результате гибридизации этой последовательности с аптамером происходит нарушение конформационной структуры аптамера, что приводит к высвобождению экзосом. Аналогичный подход был использован в работе [64] для выделения экзосом из клеточных линий, за исключением того, что экзосомы от магнитного комплекса отделяли, изменяя концентрацию NaCl. Возможность выделения экзосом из мочи с помощью CD63-аптамера показана в работе [65]. Модифицированный тиоловыми группами аптамер был иммобилизован на титановой оболочке магнитных частиц (Fe₃O₄@TiO₂-DNA aptamer). Двойное специфическое связывание частиц с экзосомами достигалось как с помошью аптамера. так и с помощью диоксида титана TiO₂, который, как было установлено, избирательно связывается с фосфатными группами на поверхности билипидной мембраны экзосом. После стандартной процедуры концентрирования на магнитных частицах под действием магнита экзосомы элюировали путем гидролиза аптамера ДНКазой и отмывкой в 10% NH₄OH (для нарушения связи диоксида титана с фосфатными группами). Авторы показали, что разработанный комплекс позволяет за 10 мин выделить из мочи 92.6% экзосом, которые сохраняют интактность, содержат маркеры экзосом мочи и по протеомному составу близки к экзосомам, выделенным ультрацентрифугированием.

Преципитация лектинами

Метод основан на специфическом и обратимом связывании лектинов (гликопротеинов, в основном растительного происхождения) с углеводными остатками (такими как, гликаны), присутствующими на поверхности клеток и мембранных везикул. Связывание лектинов с мембранами индуцирует агглютинацию везикул. Образовавшиеся агрегаты могут быть легко осаждены низкоскоростным центрифугированием. Для освобождения отдельных экзосом из агрегатов к осадку добавляют избыток простых сахаров (глюкоза или манноза), которые конкурентно разрушают связь между полисахаридами экзосом и лектинами, после чего экзосомы отмывают от лектина. Поскольку лектины связываются не только с экзосомальными мембранными олигосахаридами, то перед добавлением лектина все клетки и крупные везикулы должны быть удалены, например, центрифугированием или фильтрацией. Следует отметить, что осаждение экзосом лектинами в исследованиях используется редко, а результаты представлены в единичных методологических работах.

Лектины разного происхождения были опробованы для осаждения экзосом из разных биологических жидкостей, в частности, выделенные из цианобактерий (OAA), картофеля (STL), пшеницы (WGA), бобовых (Con A) [66]. Так, например, в работе Royo F. с соавторами для выделения экзосом из мочи использовался лектин картофеля Solanum tuberosum (STL) (Vector Laboratories) [67]. Предварительно образцы мочи очищали от клеток и их фрагментов центрифугированием при 2000 g и фильтрованием через мембрану с диаметром пор 0.22 мкм. Затем рН очищенных образцов подводили до 7.5, после чего добавляли конъюгированный с биотином лектин STL. После инкубации в течение ночи образовавшиеся STL/экзосомные комплексы собирали, используя магнитные частицы, покрытые стрептавидином. Присутствие экзосом в препаратах, выделенных лектинами, было подтверждено с помощью криоэлектронной микроскопии и Western-блота, однако по количеству РНК эти препараты значительно уступали препаратам, выделенным набором Urine Exosome RNA Isolation Kit, Norgen Biotek (0.2 против 2.7 нг/мл мочи), а также ультрацентрифугированием и Total Exosome Isolation Reagent, Invitrogen (0.2 против 0.5 нг/мл мочи). В целом, метод преципитации лектинами прост, не требует специального оборудования и дорогих реактивов, но характеризуется низким выходом и низкой чистотой целевого продукта.

Преципитация SubX-Matrix

В этом методе также используются свойства везикулярной мембраны, а именно наличие на ее поверхности кластеров фосфолипидов. Оба конца молекулы коммерческого субстрата SubX (Capital Biosciences) способны связываться с фосфатным кластером. Это свойство позволяет каждой молекуле SubX связать через мембранные фосфатные остатки две соседние экзосомы, образуя везикулярный димер. Поскольку мембранные фосфолипиды содержат много фосфатных групп, то добавление в биологическую жидкость избытка SubX вызывает образование агрегатов микронного размера, состоящих из 10-15 экзосом, которые далее эффективно осаждаются низкоскоростным центрифугированием [68]. Специально подобранный буфер позволяет диссоциировать осажденные агрегаты обратно в мономерную форму и провести дальнейший анализ экзосом. Возможности этой технологии для выделения экзосом из плазмы были представлены в работе [69]. Сравнительный анализ экзосом, выделенных по SubX-протоколу и рядом традиционных методов, показал, что SubX позволяет получить относительно чистую фракцию экзосом, уступая лишь методу иммунопреципитации. Однако эффективность метода относительно невелика: выход экзосом более чем в 10 раз меньше, чем при ультрацентрифугировании. Вместе с тем, метод очень прост, легко может быть стандартизирован и масштабирован для выделения из больших объемов.

Разделение в двухфазной системе полиэтиленгликоль—декстран

Метод основан на селективном распределении биополимеров и их комплексов между двумя фазами, образуемыми в водном растворе несовместимыми полимерами, такими как, например, декстран и полиэтиленгликоль. Эмпирически было обнаружено, что в такой двухфазной полимерной системе возможно сконцентрировать везикулы преимущественно в фазе декстрана, а белки, биополимеры и супрамолекулярные комплексы – в фазе ПЭГ [70]. Для получения более чистых препаратов экзосом можно повторно экстрагировать белки из фазы декстрана путем замены ПЭГ-фазы. Способности такой двухфазной системы избирательно концентрировать экзосомы в фазе декстрана были продемонстрированы в работах Shin H. с соавторами [71, 72]. Следует заметить, что распределение биологических частиц или молекул в двухфазной системе зависит от многих факторов, таких как ионная сила, pH, тип используемых полимеров, их концентрация и молекулярный вес, поверхностные свойства частиц, поэтому, с одной стороны, заранее предсказать поведение системы очень сложно, с другой стороны, такая многофакторность делает систему исключительно гибкой, поскольку, манипулируя параметрами, можно получать системы с разными разделяющими свойствами. Возможность оптимизации системы для выделения экзосомальной фракции показана в работе [73].

Метод анионного обмена

Благодаря отрицательному поверхностному заряду в физиологических условиях экзосомы могут быть электростатически связаны с положительно заряженным сорбентом, а потом элюированы с него буфером высокой ионной силы. Доказательства возможности такого подхода получены в работе [74]. Экзосомы были выделены из кондиционной среды различных клеточных линий, используя колонку с монолитным полимерным материалом, функционализированным четвертичными аммонийными группами (сильный анионообменный сорбент). Авторы продемонстрировали, что по таким параметрам, как выход конечного продукта, его качество и чистота, метод не уступает ультрацентрифугированию, но гораздо быстрее и проще. А по сравнению с ультрафильтрацией, значительно эффективнее отделяет экзосомы от белков. Следует отметить, что этот подход пока опробован только на кондиционных средах клеточных культур. Для того чтобы оценить возможности техники анион-обменной хроматографии для выделения экзосом из более сложных жидкостей, таких как плазма, требуются дополнительные исследования.

Альтернативный вариант, также основанный на платформе анионного обмена, предложен в работе [75]. Экзосомы из плазмы были сорбированы на магнитных частицах, покрытых поликатионным полимером (ExoCAS-2). Весь процесс выделения занимает 40 мин и состоит из трех основных этапов. Профильтрованную через 0.8 мкм фильтр плазму смешивают с магнитными частицами и инкубируют при встряхивании 30 мин. Связанные с магнитными частипами экзосомы собирают с помощью магнита и отмывают их от белков плазмы, которые сорбировались вместе с экзосомами, буфером с рН 6 (экспериментально подобранная величина в интервале pI-значений белков). Экзосомы элюируют с частиц высокосолевым раствором (1 M NaCl). Анализ выделенных экзосом (распределение по размерам, выход продукта, морфология частиц, уровень контаминации белками, состав микроРНК) показал, что ExoCAS-2-метод превосходит такие методы, как ультрацентрифугирование и коммерческие наборы ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution (System Biosciences) и exoEasy (QIAGEN).

Твердофазное связывание с карбидом кремния

Принципиально новый подход к выделению экзосом предложен компанией Norgen Biotek [76]. Он реализован в коммерческих наборах фирмы: Plasma/Serum Exosome Purification Kit, Urine Exosome Purification Kit, Cell Culture Media Exosome Purification Kits и Saliva Exosome Purification Kit. Метод основан на селективном связывании белков с отрицательно-заряженным карбидом кремния в зависимости от рН раствора и значения изоэлектрической точки белка. Значение изоэлектрической точки поверхностных экзосомальных белков отличается от изоэлектрических точек гистонов и других белков биологической жидкости, что позволяет путем оптимизации рН избирательно сорбировать, а затем элюировать экзосомы с сорбента. Процедура выделения очень простая, быстрая, масштабируемая и не требует специального оборудования. Она включает три этапа: смешивание с сорбентом (карбид кремния) в связывающем буфере, осаждение сорбента со связанными экзосомами низкоскоростным центрифугированием, элюирование экзосомальной фракции с сорбента (возможен также колоночный вариант выделения). Выделенные экзосомы могут быть далее использованы для выделения экзосомальной РНК и белков. Внеклеточные везикулы, выделенные с использованием SiC, имеют существенно сниженные уровни загрязняющих материалов, таких как макромолекулярные комплексы, рибосомы и белки, по сравнению с внеклеточными везикулами, выделенными с использованием ультрацентрифугирования или осаждающих агентов. Сравнительный анализ технологии Norgen Biotek с другими коммерческими наборами (ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution, System Biosciences и Total Exosome Isolation Reagent, Invitrogen), а также с ультрацентрифугированием, показал, что при выделении из мочи использование SiC значительно повышает выход маркерных экзосомальных белков и РНК, а также воспроизводимость результатов [67].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящее время для выделения и очистки экзосом используются различные стратегии, но до сих пор нет единого мнения о том, какой из этих методов лучше. Между тем, конечный результат, как показывают исследования, зависит от выбранного протокола выделения, поскольку у каждого метода есть свои ограничения, которые влияют на чистоту и выход экзосом. Выбор подходящего протокола должен зависеть от цели дальнейшего исследования. Например, для выявления биомаркера требуются методы, позволяющие выделять "чистые" экзосомы из небольшого объема, а в терапевтической ситуации первостепенное значение имеет функ-

циональная целостность везикул и их количество. Идеальный метод выделения экзосом для клинической диагностики имеет следующие характеристики: низкий уровень контаминации пробы, сохранение целостности везикул, высокий выход, воспроизводимость, универсальность (позволяет выделять из всех биологических жидкостей), низкая стоимость, высокая скорость выделения одновременно из большого числа проб (желательно не более одного часа), доступность и простота используемого оборудования, возможность автоматизации процесса [77]. Все используемые в настоящее время стандартные методы выделения в основном времязатратные и трудоемкие, имеют нестабильный выход целевого продукта, требуют специальной пробоподготовки. Но основная проблема связана с контаминацией экзосом различными неэкзосомальными компонентами биологической жидкости, особенно при выделении из такой комплексной жидкости, как кровь. Самым оптимальным вариантом решения проблемы на сегодня представляется использование комбинаций различных методов выделения, однако это значительно удлиняет время проведения анализа, что ограничивает использование такого подхода в клинических целях.

В последние годы ряд современных технологий фракционирования были адаптированы для выделения экзосом, например, FFF (Field flow fractionation) – метод фракционирования наночастиц в потоке под действием полей различной физической природы (электрического, магнитного, теплового, гидравлического, центробежного и др.). Так, Sitar с соавторами применили для сепарации экзосом один из вариантов FFF-фракционирования – метод фракционирования в ассиметричном потоке (AF4, Asymmetric Flow Field Flow Fractionation), в основе которого лежит разделение частиц по их размерам [78]. Выделенные этим методом экзосомы сохраняют свою морфологию и функциональность, поскольку фракционирование происходит в мягких условиях (без стационарной фазы). Этот метод позволяет не только сепарировать экзосомы плазмы от различных макромолекул, таких как липопротеины, белки и везикулы других типов, но и разделить различные субпопуляции экзосом [24, 79]. Еще одним примером относительно новой техники выделения и очистки экзосом является метод электрофореза [80]. Эта технология основана на разделении молекул по заряду. Во время электрофореза везикулы и их субпопуляции могут быть фракционированы на основе их электрофоретической подвижности, т. е. с учетом не только размера, но и заряда. Наряду с разработкой методов, основанных на новых принципах разделения частиц, активно исследуются возможности различных микрофлюидных платформ, использующих один или комбинацию разных принципов сепарации, а также позволяющих одновременно выделять экзосомы и сразу их анализировать [81].

Перспективным направлением исследований в области экзосомальных технологий является поиск новых универсальных биомаркеров этих нановезикул, в частности, мембранных белков [82]. В настоящее время для выделения экзосом широко используются тетраспанины CD9, CD63 и CD81. Однако уровень экспрессии этих мембранных белков в разных типах клеток может сильно варыировать, что ограничивает их использование для иммуноаффинного выделения экзосом, секретируемых популяциями клеток с низким уровнем этих белков. Идентификация новых универсальных биомаркеров, присутствующих в большом количестве на мембранах всех экзосом, независимо от их происхождения, может стать основой для разработки новой эффективной технологии выделения экзосом.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации ("Разработка технологии и набора реагентов для выделения экзосом из биологических жидкостей человека на основе аффинного фосфолипид-связывающего нанокомплекса". Регистрационный номер 121031100099-7).

Соответствие принципам этики. Статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- van Niel G., D'angelo G., Raposo G. 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 213–228.
- Jeppesen D.K., Fenix A.M., Franklin J.L., Higginbotham J.N., Zhang Q., Zimmerman L.J, Liebler D.C., Ping J., Liu Q., Evans R., Fissell W.H., Patton J.G., Rome L.H., Burnette D.T., Coffey R.J. 2019. Reassessment of exosome composition. *Cell*.177 (2), 428–445.
- Tkach M., Théry C. 2016. Communication by extracellular vesicles: Where we are and where we need to go. *Cell.* 164, 1226–1232.
- 4. Mathieu M., Martin-Jaular L., Lavieu G., Théry C. 2019. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell Biol.* **21**, 9–17.
- Isola A., Chen S. 2016. Exosomes: The messengers of health and disease. *Curr. Neuropharmacol.* 15, 157– 165.
- Lin Y., Anderson J.D., Rahnama L.M.A., Gu S.V., Knowlton A.A. 2020. Exosomes and extracellular vesicles in cardiovascular physiology exosomes in disease and regeneration: Biological functions, diagnostics, and

beneficial effects. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 319 (6), H1162-H1180.

- 7. de Toro J., Herschlik L., Waldner C., Mongini C. 2015. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: New insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front. Immunol.* **6**, 203.
- 8. Dai J., Su Y., Zhong S., Cong L., Liu B., Yang J., Tao Y., He Z., Chen C. 2020. Exosomes: Key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduct. Targeted Ther.* **5**, 145.
- 9. Popowski K., Lut, H., Hu S., George A., Dinh P.U., Cheng K. 2020. Exosome therapeutics for lung regenerative medicine. *J. Extracel. Vesicles.* **9** (1), 1785161.
- Zarà M., Amadio P., Campodonic, J., Sandrini L., Barbieri S.S. 2020. Exosomes in cardiovascular diseases. *Diagnostics*. 10 (11), 943.
- 11. Yang H., Ma Q., Wang Y., Tang Z. 2020. Clinical application of exosomes and circulating microRNAs in the diagnosis of pregnancy complications and foetal abnormalities. *J. Transl. Med.* **18**, 32.
- Makler A., Asghar W. 2020. Exosomal biomarkers for cancer diagnosis and patient monitoring. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 20 (4), 387–400.
- Tran P. H., Wang T., Yin W., Tran T.T., Barua H.T., Zhang, Y., Midge S.B., Nguyen T.N.G., Lee B.-J., Duan W. 2019. Development of a nanoamorphous exosomal delivery system as an effective biological platform for improved encapsulation of hydrophobic drugs. *Int. J. Pharm.* 566, 697–707.
- Liang Y., Duan L., Lu J., Xia J. 2021. Engineering exosomes for targeted drug delivery. *Theranostics*. 11, 3183–3195.
- Salunkhe S., Dheeraj Basak M., Chitkara D., Mittal A. 2020. Surface functionalization of exosomes for targetspecific delivery and in vivo imaging & tracking: Strategies and significance. *J. Control. Release.* **326**, 599– 614.
- Xu Z., Zeng S., Gong Z., Yan Y. 2020. Exosome-based immunotherapy: A promising approach for cancer treatment. *Mol. Cancer.* 19, 160.
- Barros F.M., Carneiro F., Machado J.C., Melo S.A. 2018. Exosomes and immune response in cancer: Friends or foes? *Front. Immunol.* 9, 730.
- Maqsood M., Kang M., Wu X., Chen J., Teng L., Qiu L. 2020. Adult mesenchymal stem cells and their exosomes: Sources, characteristics, and application in regenerative medicine. *Life Sci.* 256, 118002.
- Brennan K., Martin K., FitzGerald S.P., O'Sullivan J., Wu Y., Blanco A., Richardson C., Mc Gee M. 2020. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Sci. Rep.* 10, 1039.
- Martins T.S., Catita J., Rosa I.M., da Cruz e Silva O.A.B., Henriques A.G. 2018. Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches. *PLoS One.* 13 (6), e0198820.
- Langevin S.M., Kuhnell D., Biesiada J., Zhang X., Medvedovic M., Talaska G.G., Burns K.A., Kasper S. 2020. Comparability of the small RNA secretome

across human biofluids concomitantly collected from healthy adults. *PLoS One*. **15** (4), e0229976.

- Buschmann D., Kirchner B., Hermann S., Märte M., Wurmser C., Brandes F., Kotschote S., Bonin M., Steinlein O.K., Pfaffl M.W., Schelling.G., Reithmair M. 2018. Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing. *J. Extracel. Vesicles.* 7 (1), 1481321.
- 23. Mussack V., Wittmann G., Pfaffl M.W. 2019. Comparing small urinary extracellular vesicle purification methods with a view to RNA sequencing—Enabling robust and non-invasive biomarker research. *Biomol. Detect. Quantif.* **17**, 100089.
- Zhang H., Freitas D., Kim H.S., Fabijanic K., Li Z., Chen H., Mark M.T., Molina H., Martin A.B., Bojmar L., Fang J., Rampersaud S., Hoshino A., Irina Matei I., Kenific C.M., Nakajima M., Mutvei A.P., Sansone P., Buehring W., Wang H., Jimenez J.P., Cohen-Gould L., Paknejad N., Brendel M., Manova-Todorova K., Magalhães A., Ferreira J.A., Osório H., Silva A.M., Ashish Massey A., Cubillos-Ruiz J.R., Galletti G., Giannakakou P., Cuervo A.M., Blenis J., Schwartz R., Brady M.S., Peinado H., Bromberg J., Matsui H., Reis C.A., Lyden D. 2018. Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat. Cell Biol.* 20, 332–343.
- 25. Sverdlov E.D. 2012. Amedeo Avogadro's cry: What is 1 μg of exosomes? *BioEssays.* **34**, 873–875.
- Johnsen K.B., Gudbergsson J.M., Andresen T.L, Simonsen J.B. 2019. What is the blood concentration of extracellular vesicles? Implications for the use of extracellular vesicles as blood-borne biomarkers of cancer. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 1871 (1), 109–116.
- Fernández-Llama P., Khositseth S., Gonzales P.A., Star R.A., Pisitkun T., Knepper M.A. 2010. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int.* 77 (8), 736–742.
- Livshits M.A., Khomyakova E., Evtushenko E.G., Lazarev V.N., Kulemin N.A., Semina S.E. 2015. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci. Rep.* 5, 17319.
- Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath J.P., Primdal-Bengtson B., Dingli F., Loew D., Tkach M., Théry C. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 113 (8), E968–E977.
- Whiteside T.L. 2015. The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 15 (10), 1293–1310.
- Singh K., Nalabotala R., Koo K.M., Bose S., Nayak R., Shiddiky M.J. 2021. Separation of distinct exosome subpopulations: Isolation and characterization approaches and their associated challenges. *Analyst.* 146, 3731–3749.
- 32. Raj D.A.A., Fiume I., Capasso G., Pocsfalvi G. 2012. A multiplex quantitative proteomics strategy for protein

biomarker studies in urinary exosomes. *Kidney Int.* **81**, 1263–1272.

- Yu L.L., Zhu J., Liu J.X., Jiang F., Ni W.K., Qu L.S., Ni R.Z., Lu C.H, Xiao M.B. 2018. A comparison of traditional and novel methods for the separation of exosomes from human samples. *BioMed. Res. Int.* 2018, 3634563.
- van Veldhoven P.P., Baumgart E., Mannaerts G.P. 1996. Iodixanol (optiprep), an improved density gradient medium for the iso-osmotic isolation of rat liver peroxisomes. *Anal. Biochem.* 237 (1), 17–23.
- 35. Li X., Donowitz M. 2008. Fractionation of subcellular membrane vesicles of epithelial and nonepithelial cells by OptiPrep[™] density gradient ultracentrifugation. In: *Exocytosis and endocytosis. Methods in Molecular Biology*, **440**. Eds Ivanov A.I., New York: Humana Press, p. 97–110.
- Cantin R., Diou J., Bélanger D., Tremblay A. M., Gilbert C. 2008. Discrimination between exosomes and HIV-1: Purification of both vesicles from cell-free supernatants. *J. Immunol. Methods.* 338 (1–2), 21–30.
- Merchant M.L., Powell D.W., Wilkey D.W., Cummins T.D., Deegens J., Rood I.M., McAfee K.J., Fleischer C., Klein E., Klein J.B. 2010. Microfiltration isolation of human urinary exosomes for characterization by MS. *Proteomics Clin. Appl.* 4 (1), 84–96.
- Gerlach J.Q., Krüger A., Gallogly S., Hanley S.A., Hogan M.C., Ward C.J., Joshi L., Griffin M.D. 2013. Surface glycosylation profiles of urine extracellular vesicles. *PLoS One.* 8 (9), e74801.
- Alvarez M.L., Khosroheidari M., Kanchi Ravi R., Distefano J.K. 2012. Comparison of protein, microR-NA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int.* 82, 1024–1032.
- Andreu Z., Rivas E., Sanguino-Pascual A., Lamana A., Marazuela M., González-Alvaro I., Sánchez-Madrid F., de la Fuente H. Yáñez-Mó M. 2016. Comparative analysis of EV isolation procedures for miRNAs detection in serum samples. *J. Extracel. Vesicles.* 5 (1), 31655.
- Taylor D.D., Shah S. 2015. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods*. 87, 3–10.
- Sidhom K., Obi P.O., Saleem A.A. 2020. A review of exosomal isolation methods: Is size exclusion chromatography the best option? *Int. J. Mol. Sci.* 21 (18), 6466.
- Baranyai T., Herczeg K., Onódi Z., Voszka I., Módos K., Marton N., Nagy G., Mäger I., Wood M.J., Andaloussi S.E.I., Pálinkás Z., Kumar V., Nagy P., Ágnes Kittel A., Buzás E.I., Ferdinandy P., Giricz Z. 2015. Isolation of exosomes from blood plasma: Qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. *PLoS One*. 10 (12), e0145686.
- Hagel L., Ostberg M., Andersson T. 1996. Apparent pore size distributions of chromatography media. *J. Chromatogr. A.* 743 (1), 33–42.
- Arntz O.J., Pieters B.C., van Lent P., Koenders M.I., van der Kraan P.M., van de Loo F.A. 2020. An optimized method for plasma extracellular vesicles isola-

tion to exclude the copresence of biological drugs and plasma proteins which impairs their biological characterization. *PLoS One.* **15** (7), e0236508.

- Gámez-Valero A., Monguió-Tortajada M., Carreras-Planella L., Beyer K., Borràs F.E. 2016. Size-exclusion chromatography-based isolation minimally alters extracellular vesicles' characteristics compared to precipitating agents. *Sci. Rep.* 6, 33641.
- Lohmann L.J., Strube J. 2020. Accelerating biologics manufacturing by modeling: Process integration of precipitation in mAb downstream processing. *Processes*. 8 (1), 58.
- 48. Atha D.H., Ingham K.C. 1981. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume. *J. Biol. Chem.* **256** (23), 12108–12117.
- 49. Marenduzzo D., Finan K., Cook P.R. 2006. The depletion attraction: An underappreciated force driving cellular organization. *J. Cell Biol.* **175** (5), 681–686.
- 50. Ludwig A.K., De Miroschedji K., Doeppner T.R., Börger V., Ruesing J., Rebmann V., Durst S., Jansen S., Bremer M., Behrmann E., Singer B.B., Jastrow H., Kuhlmann J.D., Magraoui F.E.I., Meyer H.E., Hermann D.M., Opalka B., Raunser S., Epple M., Horn P.A., Giebel B. 2018. Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales. *J. Extracel. Vesicles*. **7** (1), 1528109.
- Rider M.A., Hurwitz S.N., Meckes D.G. 2016. ExtraPEG: A polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles. *Sci. Rep.* 6, 23978.
- Weng Y., Sui Z., Shan Y., Hu Y., Chen Y., Zhang L., Zhang Y. 2016. Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for indepth proteome profiling. *Analyst.* 141 (15), 4640– 4646.
- 53. Garcia-Romero N., Madurga R., Rackov G., Palacin-Aliana I., Nunez-Torres R., Asensi-Puig A., Carrión-Navarro J., Esteban-Rubio S., Peinado H., González-Neira A., González-Rumayor V., Belda-Iniesta C., Ayuso-Sacido A. 2019. Polyethylene glycol improves current methods for circulating extracellular vesiclederived DNA isolation. J. Transl. Med. 17 (1), 75.
- 54. Neerukonda S.N., Egan N.A., Patria J., Assakhi I., Tavlarides-Hontz P., Modla S., Muñoz E.R., Hudsond M.B., Parcells M.S. 2020. A comparison of exosome purification methods using serum of Marek's disease virus (MDV)-vaccinated and-tumor-bearing chickens. *Heliyon.* **6** (12), e05669.
- 55. Konoshenko M.Y., Lekchnov E.A., Bryzgunova O.E., Kiseleva E., Pyshnaya I.A., Laktionov P.P. 2021. isolation of extracellular vesicles from biological fluids via the aggregation-precipitation approach for downstream miRNAs detection. *Diagnostics.* 11 (3), 384.
- Grunt M., Failla A.V., Stevic I., Hillebrand T., Schwarzenbach H. 2020. A novel assay for exosomal and cell-free miRNA isolation and quantification. *RNA Biol.* 17, 425–440.

- Hay I.D., Rehman Z.U., Moradali M.F., Wang Y., Rehm B.H. 2013. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microb. Biotechnol.* 6 (6), 637–650.
- Deregibus M.C., Figliolini F., D'antico S., Manzini P.M., Pasquino C., De Lena M., Tetta C., Brizzi.M.F., Camussi, G. 2016. Charge-based precipitation of extracellular vesicles. *Int. J. Mol. Med.* 38 (5), 1359–1366.
- Brownlee Z., Lynn K.D., Thorpe P.E, Schroit A.J. 2014. A novel "salting-out" procedure for the isolation of tumor-derived exosomes. *J. Immunol. Methods.* 407, 120–126.
- Clayton A., Court J., Navabi H., Adams M., Mason M.D., Hobot J.A., Newman G.R., Jasani B. 2001. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* 247 (1–2), 163–174.
- Oksvold M.P., Neurauter A., Pedersen K.W. 2015. Magnetic bead-based isolation of exosomes. In: *RNA Interference. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. **1218**. Eds Sioud M. New York: Humana Press, p. 465–481.
- Ueda K., Ishikawa N., Tatsuguchi A., Saichi N., Fujii R., Nakagawa H. 2014. Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes. *Sci. Rep.* 4, 6232.
- Zhang K., Yue Y., Wu S., Liu W., Shi J., Zhang Z. 2019. Rapid capture and nondestructive release of extracellular vesicles using aptamer-based magnetic isolation. *ACS sensors.* 4 (5), 1245–1251.
- Song Z., Mao J., Barrero R.A., Wang P., Zhang F., Wang T. 2020. Development of a CD63 aptamer for efficient cancer immunochemistry and immunoaffinitybased exosome isolation. *Molecules*. 25 (23), 5585.
- Zhang N., Sun N., Deng C. 2021. Rapid isolation and proteome analysis of urinary exosome based on double interactions of Fe₃O₄@TiO2-DNA aptamer. *Talanta*. 221, 121571.
- 66. Liangsupree T., Multia E., Riekkola M.L. 2021. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *J. Chromatogr. A.* **1636**, 461773.
- 67. Royo F., Zuñiga-Garcia P., Sanchez-Mosquera P., Egia A., Perez A., Loizaga A., Arceo R., Lacasa I., Rabade, A., Edurne Arrieta E., Bilbao R., Unda M., Carracedo.A., Falcon-Perez J.M. 2016. Different EV enrichment methods suitable for clinical settings yield different subpopulations of urinary extracellular vesicles from human samples. *J. Extracel. Vesicles.* 5 (1), 29497.
- Malykh A.G., Malek A., Lokshin A., Evtushenko V. 2018. Simultaneous isolation of exosomes and cfDNA from liquid biopsies using universal kit based on SubX-Matrix TM technology. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting. 2018 Apr 14–18; Chicago, IL. *Cancer Res.* 2018. **78** (13 Suppl). Abstract nr 1618. https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2018-1618
- Shtam T., Evtushenko V., Samsonov R., Zabrodskaya Y., Kamyshinsky R., Zabegina L., Verlov N., Burdakov V., Garaeva L., Slyusarenko M., Nikiforova N., Konevega A.,

Malek A. 2020. Evaluation of immune and chemical precipitation methods for plasma exosome isolation. *PLoS One.* **15** (11), e0242732.

- Kim J., Shin H., Kim J., Kim J., Park J. 2015. Isolation of high-purity extracellular vesicles by extracting proteins using aqueous two-phase system. *PLoS One*. 10 (6), e0129760.
- Shin H., Park Y.H., Kim Y.G., Lee J.Y, Park J. 2018. Aqueous two-phase system to isolate extracellular vesicles from urine for prostate cancer diagnosis. *PLoS One.* 13 (3), e0194818.
- Shin H., Han C., Labuz J.M., Kim J., Kim J., Cho S., Gho Y.S., Takayama S., Park J. 2015. High-yield isolation of extracellular vesicles using aqueous two-phase system. *Sci. Rep.* 5, 13103.
- 73. Slyusarenko M., Nikiforova N., Sidina E., Nazarova I., Egorov V., Garmay Y., Merdalimova A., Yevlampieva N., Gorin D., Malek A. 2021. Formation and evaluation of a two-phase polymer system in human plasma as a method for extracellular nanovesicle isolation. *Polymers.* 13 (3), 458.
- 74. Heath N., Grant L., De Oliveira T.M., Rowlinson R., Osteikoetxea X., Dekker N., Overman R. 2018. Rapid isolation and enrichment of extracellular vesicle preparations using anion exchange chromatography. *Sci. Rep.* 8, 5730.
- 75. Kim H., Shin, S. 2021. ExoCAS-2: Rapid and pure isolation of exosomes by anionic exchange using magnetic beads. *Biomedicines*. **9** (1), 28.
- Haj-Ahmad Y., Norgen Biotek Corp. 2018. Methods for extracellular vesicle isolation and selective removal. *United States Patent US10160964B2*. 2018. Dec 25.
- Abhange K., Makler A., Yi Wen Y., Ramnauth N., Mao W., Asghar W., Wan Y. 2021. Small extracellular vesicles in cancer. *Bioact. Mater.* 6 (11), 3705–3743.
- Sitar S., Kejžar A., Pahovnik D., Kogej K., Tušek-Žnidarič M., Lenassi M., Žagar E. 2015. Size characterization and quantification of exosomes by asymmetricalflow field-flow fractionation. *Anal. Chem.* 87 (18), 9225–9233.
- 79. Kim Y.B., Yang J.S., Lee G.B., Moon M.H. 2020. Evaluation of exosome separation from human serum by frit-inlet asymmetrical flow field-flow fractionation and multiangle light scattering. *Anal. Chim. Acta.* **1124**, 137–145.
- Morani M., Mai T.D., Krupova Z., Defrenaix P., Multia E., Riekkola M.L., Taverna M. 2020. Electrokinetic characterization of extracellular vesicles with capillary electrophoresis: A new tool for their identification and quantification. *Anal. Chim. Acta.* **1128**, 42–51.
- Lin B., Lei Y., Wang J., Zhu L., Wu Y., Zhang H., Wu L., Zhang P., Yang C. 2021. Microfluidic-based exosome analysis for liquid biopsy. *Small Methods*. 5 (3), 2001131.
- Kugeratski F.G., Hodge K., Lilla S., McAndrews K.M., Zhou X., Hwang R.F., Zanivan S., Raghu Kalluri R. 2021. Quantitative proteomics identifies the core proteome of exosomes with syntenin-1 as the highest abundant protein and a putative universal biomarker. *Nat. Cell Biol.* 23 (6), 631–641.

Principles and Problems of Exosome Isolation from Biological Fluids

E. I. Yakubovich^{1,} *, A. G. Polischouk¹, V. I. Evtushenko¹

¹Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 197758 Russia

*e-mail: jakubovichelena@mail.ru

Exosomes, a subclass of small membrane extracellular vesicles, have great diagnostic and therapeutic potential, but the lack of standardized methods for their efficient isolation and analysis limits the introduction of exosomal technologies into clinical practice. This review discusses the problems associated with the isolation of exosomes from biological fluids, as well as the principles of traditional and alternative methods of isolation. The aim of the presented review is to illustrate the variety of approaches based on the physical and biochemical properties of exosomes that can be used for exosome isolation. The advantages and disadvantages of different methods are discussed.

Keywords: microvesicles, exosomes, bioseparation, isolation methods

УДК 577.352

ЛАТЕРАЛЬНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИЛИНДРИЧЕСКИХ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ПЕПТИДОВ В ОДНОМЕРНОМ ПРИБЛИЖЕНИИ

© 2022 г. О. В. Кондрашов^{*a*}, С. А. Акимов^{*a*}, *

^аИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия *e-mail: akimov_sergey@mail.ru Поступила в редакцию 12.01.2022 г. После доработки 03.03.2022 г. Принята к публикации 04.03.2022 г.

Различные мембранные включения могут индуцировать деформации бислойных липидных мембран. Характерная длина распространения деформаций по мембране составляет несколько нанометров. Перекрывание деформаций, индуцированных различными мембранными включениями, приводит к их эффективному латеральному взаимодействию. Энергия взаимодействия может быть рассчитана в рамках адекватной теории упругости. Однако практически такой расчет может быть проведен в аналитическом виде только для эффективно одномерных систем, например, обладающих трансляционной или вращательной симметрией. В общем случае систем с низкой симметрией задача аналитически не решается. Мы теоретически рассмотрели взаимодействие двух цилиндрических трансмембранных пептидов, опосредованное деформациями мембраны. Энергии взаимодействия были получены путем численной минимизации функционала упругой энергии. Кроме того, мы рассчитали энергии взаимодействия в одномерном приближении, предполагая, что система обладает трансляционной симметрией. Было показано, что одномерное приближение достаточно хорошо воспроизводит результаты точного численного расчета в липидных бислоях различной толщины и жесткости.

Ключевые слова: липидная мембрана, теория упругости, трансмембранный пептид, латеральное взаимодействие

DOI: 10.31857/S0233475522030069

введение

Бислойные липидные мембраны являются основным структурным элементом клеточных мембран. За счет чрезвычайно низкой проницаемости, мембраны выполняют в клетках барьерную функцию, изолируя содержимое клеточных органелл от цитоплазмы и цитоплазмы от окружающей среды. Барьерные свойства мембран позволяют поддерживать неравномерное пространственное распределение различных веществ и электрических потенциалов, необходимое для жизнедеятельности клеток, являющихся открытыми неравновесными системами.

Обмен клетки с окружающей средой небольшими молекулами и ионами обеспечивается встроенными в мембрану специализированными каналами и обменниками (пассивный транспорт) или насосами (активный транспорт). Проникновение в клетку или выход из нее крупных молекул или надмолекулярных объектов происходит посредством эндоцитоза и экзоцитоза, соответ-

ственно. Примечательно, что при экзоцитозе и эндоцитозе барьерная функция мембран не нарушается: как правило, в этих процессах цитоплазма и окружающая среда ни в какой момент времени не бывают непрерывно связаны, т.е. слияние (экзоцитоз) и деление (эндоцитоз) мембран в норме происходят без утечки [1-3]. Отсутствие утечки подразумевает тонкую перестройку липидного матрикса в этих процессах, сопровождающуюся сильными деформациями мембран [1-5]. Энергия, необходимая для реализации деформаций, обеспечивается работой специализированных белков слияния и деления. Характерная величина энергии деформаций, как правило, настолько велика, что именно она определяет высоты активационных барьеров и, соответственно, скорость протекания процессов [1, 3, 6].

Энергия деформации может быть количественно оценена в рамках адекватной теории упругости. По-видимому, первая теория упругости липидных мембран была разработана Хельфрихом в 1973 году [7]. В ней учитывалась только деформация, аналогичная поперечному изгибу в смектических жилких кристаллах, а также вклад гауссовой кривизны, являющийся топологическим инвариантом. Деформации считались малыми, и энергия вычислялась в квадратичном приближении (закон Гука). По мере развития экспериментальной техники становились доступны для наблюдения дополнительные деформационные моды. Оказалось, что для описания промежуточных структур процесса слияния мембран необходимо учитывать деформацию наклона, при которой оси липидных молекул отклоняются от нормали к поверхности липидного монослоя. Деформация наклона была введена в теорию упругости мембран в работе Хамма и Козлова [8]. Более строгий учет вкладов деформаций во втором порядке был сделан в работе Терци и Дезерно [9], в которой было введено перекрестное слагаемое по деформациям наклона и поперечному изгибу. Однако полученный функционал энергии не мог описывать стабильную упругую систему, поскольку он не являлся положительно определенной квадратичной формой малых деформаций [10], и упругая энергия, в принципе, могла понижаться при бесконечном увеличении амплитуды деформаций. Для получения функционала упругой энергии, стабильного в указанном смысле, необходимо дополнительно учитывать вклад, квадратичный по градиенту деформации поперечного изгиба [10]. При использовании функционалов упругой энергии различной степени полноты и точности вычисляется энергия деформаций липидных монослоев. При этом деформирующие мембрану белки и пептиды сами, как правило, считаются твердыми и недеформируемыми. В рамках теории упругости белки и пептиды учитываются через условия на их границе с липидным монослоем, которые налагаются на деформации мембраны, например на толщину бислоя, ориентацию липидных молекул, краевой угол поверхности липидного монослоя на границе с белком и т.д. [5, 11, 12].

Периферические белки и амфипатические пептиды частично встраиваются в липидный монослой, раздвигая в стороны полярные головки липидов [13, 14]. Трансмембранные белки и пептиды с приблизительно цилиндрической формой трансмембранной части деформируют липидный бислой, если длина трансмембранного участка не совпадает с толщиной гидрофобной части мембраны [15–17]. Когда твердые мембранные включения расположены далеко друг от друга, вызываемые ими деформации мембраны независимы, и их энергия аддитивна. При сближении включений деформации перекрываются, что приводит к эффективному латеральному взаимодействию; характерная длина затухания деформаций в мембране составляет несколько нанометров [12, 18, 19].

Для расчета энергии деформаций обычно используются квадратичные функционалы упругой энергии, применимые лишь в случае малых деформаций [7-10]. Для нахождения пространственного распределения деформаций функционал упругой энергии минимизируется, что приводит к системе линейных дифференциальных уравнений, которая решается в заданных граничных условиях. Для систем, обладающих трансляционной или вращательной симметрией, т.е. являющихся практически одномерными, минимизация функционала упругой энергии приводит к системе обыкновенных линейных дифференциальных уравнений, решение которой может быть получено в аналитическом виде [11, 12]. Однако в случае низкой симметрии рассматриваемой системы получаются уравнения в частных производных, которые, как правило, не удается решить аналитически. В частности, даже простейшая задача о нахождении энергии взаимодействия двух цилиндрических трансмембранных пептидов аналитически не решается [11]. В таких случаях функционал упругой энергии может быть минимизирован численно для каждого заданного набора граничных условий.

Ранее было показано, что латеральное взаимолействие двух частично встроенных в мембрану амфипатических пептидов может быть с хорошей точностью описано в рамках одномерного приближения [12]. В этом приближении предполагается, что оси пептидов параллельны друг другу, длина пептидов бесконечна и система обладает трансляционной симметрией вдоль направления осей пептидов. В такой эффективно одномерной системе энергия деформаций мембраны, отнесенная к единице длины вдоль направления трансляционной симметрии, может быть рассчитана аналитически. Для получения абсолютной величины энергии деформаций мембраны, индуцируемых пептидами конечной длины, необходимо погонную энергию, рассчитанную в одномерном приближении, умножить на эффективную "деформационную" длину пептида. Если оси пептидов практически параллельны друг другу, то "деформационная" длина превышает фактическую длину пептида приблизительно на 1 нм [12]. Если же оси пептидов существенно не параллельны и пересекаются под значительным углом, условно от $\pi/4$ до $3\pi/4$, то эффективная "деформационная" длина приблизительно равна размеру (диаметру) пептида в направлении, перпендикулярном его продольной оси. Данное одномерное приближение оказывается близко к подходу Дерягина для расчета энергии взаимодействия, опосредованного быстро (экспоненциально) монотонно убывающими силами в конфигурациях с относительно низкой симметрией [20].

В настоящей работе мы рассмотрели латеральное взаимодействие двух цилиндрических трансмембранных пептидов, опосредованное упругими деформациями мембраны. В данной системе распределение деформаций и их энергия не могут быть получены в аналитическом виде, поэтому мы находили их путем численной минимизации функционала упругой энергии. Энергия взаимодействия двух трансмембранных пептидов была рассчитана аналитически в одномерном приближении в предположении, что система обладает трансляционной симметрией в направлении, перпендикулярном отрезку, соединяющему центры двух пептидов. Мы показали, что взаимодействие цилиндрических трансмембранных пептидов достаточно точно описывается в одномерном приближении.

ПОСТАНОВКА И РЕШЕНИЕ ЗАДАЧИ

Энергию деформаций мембраны будем рассчитывать в рамках теории упругости Хамма-Козлова [8], обобщенной для учета дополнительных деформационных мод [11, 12]. Состояние деформированного участка липидного монослоя определяется векторным полем единичных векторов **n**, называемых директорами, характеризующими среднюю ориентацию липидных молекул. Поле директоров задается на некоторой поверхности, называемой нейтральной, проходящей внутри монослоя параллельно его границе с водой в области сочленения полярных головок с гидрофобными цепями липидов. Форма нейтральной поверхности характеризуется векторным полем ее единичных нормалей N. Введем декартову систему координат Охуг таким образом, чтобы плоская межмонослойная поверхность в исходном недеформированном состоянии совпадала с плоскостью Oxv, ось Oz была перпендикулярна плоскости недеформированной мембраны, начало координат О было расположено в середине отрезка, соединяющего центры трансмембранных пептидов, а ось Ох была направлена вдоль этого отрезка (рис. 1). Монослой, находящийся в области z > 0 будем называть верхним, а в области z < 0 – нижним. Форму нейтральной поверхности верхнего монослоя будем задавать *z*-координатами ее точек, функцией H(x, y) (рис. 1). Будем учитывать следующие деформации: 1) поперечный изгиб, характеризующийся дивергенцией директора вдоль нейтральной поверхности, $div(\mathbf{n})$; 2) наклон, характеризующийся вектором наклона $\mathbf{t} = \mathbf{n} - \mathbf{N}$; 3) латеральное растяжениесжатие, характеризующееся относительным изменением площади нейтральной поверхности, $\alpha = (a - a_0)/a_0$, где a, a_0 – текущая и исходная площади нейтральной поверхности, приходящиеся на одну липидную молекулу, соответственно;

4) гауссову кривизну
$$K = \frac{\partial n_x}{\partial x} \frac{\partial n_y}{\partial y} - \frac{\partial n_x}{\partial y} \frac{\partial n_y}{\partial x}$$
 где n_x ,

 n_y — проекции директора на соответствующие оси; 5) кручение, характеризующееся ротором директора, **rot(n)**; 6) латеральное натяжение, определяющее работу, которую необходимо совершить для увеличения площади липидного монослоя, пропорциональную [**grad**(H(x, y))]². Деформации считаются малыми, и энергия записывается во втором порядке по ним следующим образом [11, 12]:

$$W = \int dS \left\{ \frac{B}{2} [\operatorname{div}(\mathbf{n}) + J_0]^2 - \frac{B}{2} J_0^2 + \frac{K_t}{2} \mathbf{t}^2 + \frac{\sigma}{2} [\operatorname{grad}(H)]^2 + \frac{K_a}{2} \alpha^2 + K_G K + \frac{K_{\operatorname{rot}}}{2} [\operatorname{rot}(\mathbf{n})]^2 \right\},$$
(1)

где $B, K_t, K_a, K_G, K_{rot}$ – модули поперечного изгиба, наклона, латерального растяжения-сжатия, гауссовой кривизны и кручения, соответственно; *J*₀ – спонтанная кривизна липидного монослоя; σ – латеральное натяжение липидного монослоя; интегрирование ведется по нейтральной поверхности. Мембрана со встроенными в нее трансмембранными цилиндрическими пептидами обладает зеркальной симметрией относительно межмонослойной поверхности, которая при деформации остается плоской. В связи с этим все описание можно относить к одному монослою, для определенности, верхнему, а затем получаемые значения энергии умножить на два. Модуль объемного сжатия мембран очень велик (~ $10^{10} \text{Дж/м}^3 \approx 3 \times 10^3 k_{\text{B}} T/\text{нм}^3$ [21], где $k_{\text{B}} T \approx 4.14 \times 10^{-21} \text{ Дж}$), поэтому гидрофобную часть липидного монослоя можно считать локально объемно несжимаемой. Условие объемной несжимаемости налагает связь на возможные деформации. С требуемой точностью оно может быть записано в виде [8]:

$$H = h - \frac{h^2}{2} \operatorname{div}(\mathbf{n}) - h\alpha, \qquad (2)$$

где h — толщина гидрофобной части липидного монослоя (рис. 1), которую далее будем называть просто толщиной монослоя. Это условие позволяет выразить относительное изменение площади нейтральной поверхности α через дивергенцию директора и форму нейтральной поверхности H(x, y). Вектор единичной нормали к нейтральной поверхности может быть выражен через ее форму: $\mathbf{N} = (\partial H/\partial x, \partial H/\partial y, -1)^T$, где *T* обозначает транспонирование. Таким образом, функционал упругой энергии (1) может быть записан в следующем виде [12, 22]:



 r_0

Рис. 1. Мембрана с двумя трансмембранными пептидами. Пептиды радиуса r_0 и длины L_p расположены на расстоянии L (между центрами) друг от друга; расстояние между границами пептидов $L_0 = L - 2r_0$. Толщина гидрофобной части бислоя 2*h*. Введена декартова система координат, начало *O* которой расположено в плоскости межмонослойной поверхности посередине отрезка, соединяющего центры пептидов. Форма нейтральной поверхности верхнего монослоя задается функцией H(x, y). На границах пептидов директор **n**₀ вертикален.

 L_0

 r_0

$$W = \int dS \left\{ \frac{B}{2} [\operatorname{div}(\mathbf{n}) + J_0]^2 - \frac{B}{2} J_0^2 + \frac{K_t}{2} [\mathbf{n} - \mathbf{grad}(H)]^2 + \frac{\sigma}{2} [\mathbf{grad}(H)]^2 + \frac{K_a}{2h^2} \left[h - \frac{h^2}{2} \operatorname{div}(\mathbf{n}) - H \right]^2 + K_G K + \frac{K_{\text{rot}}}{2} [\operatorname{rot}(\mathbf{n})]^2 \right\}.$$
(3)

Функционал энергии необходимо дополнить граничными условиями. Вдали от трансмембранных пептидов мембрана считается плоской и невозмущенной; соответственно, директоры и нормали параллельны друг другу и оси *Oz*:

$$\mathbf{n}(\infty) = \mathbf{N}(\infty) = (0, 0, -1)^T, \quad H(\infty) = h.$$
(4)

На границе каждого вертикального цилиндрического трансмембранного пептида ставятся следующие условия:

$$n_n(r = r_0) = 0, \quad n_t(r = r_0) = 0, \quad H(r = r_0) = L_p/2, \quad (5)$$

где r_0 — радиус пептида; n_n , n_t — нормальная и касательная к границе пептида компоненты граничного директора \mathbf{n}_0 соответственно; L_p — длина трансмембранного пептида (рис. 1).

Вариация функционала (3) по директору и форме нейтральной поверхности монослоя приводит к системе линейных уравнений в частных производных, которая не может быть решена аналитически при граничных условиях (4), (5). Поэтому минимизация функционала проводилась численно с использованием метода конечных элементов с адаптивной расчетной сеткой, аналогично работам [12, 22, 23]. Плоскость *Оху* разбивалась на элементарные треугольники. В каждом треугольнике поля деформаций, определяемые функциями $\mathbf{n}(x, y) = (n_x(x, y), n_y(x, y), -1)^T$ u H(x, y), аппроксимировались линейными функциями координат (x, y), т.е. поля деформаций заменялись их линейными интерполянтами, заданными на узлах расчетной сетки (вершинах элементарных треугольников). Линейные интерполянты деформаций подставлялись в функционал упругой энергии (3), и поверхностная плотность энергии аналитически интегрировалась по площади каждого элементарного треугольника. Далее бралась сумма энергий по всем треугольным ячейкам расчетной сетки, т.е. по всей нейтральной поверхности липидного монослоя, и получалась полная упругая энергия монослоя W_{total} . В это выражение для W_{total} квадратично входят неизвестные значения деформационных полей в узлах расчетной сетки. Чтобы получить численное значение полной упругой энергии, функция W_{total} аналитически минимизировалась по значениям полей деформации в узлах сетки, за исключением тех, которые задаются граничными условиями. Граничные условия (4) при $x, y \rightarrow \infty$ фактически задавались на расстоянии не менее 25 нм от трансмембранных пептидов. Это расстояние существенно превышает характерные длины затухания деформаций мембраны, которые обычно составляют несколько нанометров [12, 22].

Для повышения точности приближенного расчета энергии использовались неоднородные сетки: поверхностная плотность узлов расчетной сетки в окрестности трансмембранных пептидов была повышенной. Границы трансмембранных пептидов в верхнем и нижнем монослоях представлялись в виде кусочно-линейных функций. Окрестность границы пептида разделялась на пять областей; каждая область определялась неравенством $r_{i-1} \leq d \leq r_i$, где d — расстояние до границы пептида; r_{i-1} , r_i – константы, определяющие внутреннюю и внешнюю границы областей соответственно для i = 1, 2, 3, 4, 5. Численные значения r_i были следующими: $r_0 = 0$; $r_1 = 1$ нм; $r_2 =$ = 1.5 нм; r_3 = 4 нм; r_4 = 11 нм; r_5 = ∞ . Максимальная площадь элементарного треугольника расчетной сетки ограничивалась величиной 0.5 у (в нм²). Введенные пять областей разбивались на элементарные треугольники, площадь которых не превышала $\gamma \theta_i$, где $\theta_1 = 0.01, \theta_2 = 0.02, \theta_3 = 0.04, \theta_4 =$ $= 0.05, \theta_5 = 0.5$. Этот алгоритм позволяет получить численное значение W_{total} для каждого конкретного значения γ, устанавливаемого вручную. Для повышения точности расчетов величина энергии *W*_{total} рассчитывалась при пяти последовательно уменьшающихся значениях $\gamma = 1.5$; 1.25; 1.05; 0.85; 0.62. Затем полученная таким образом зависимость W_{total} от γ аппроксимировалась полиномом второй степени и экстраполировалась на нулевой размер ячейки расчетной сетки, $\gamma \to 0$. Однако

1

оказалось, что значение W_{total} , рассчитанное для самой грубой сетки, соответствующей $\gamma = 1.5$, отличается от величины W_{total} , получаемой в результате экстраполяции при $\gamma \rightarrow 0$, не более чем на 1.5%. В связи с этим большая часть расчетов проводились на самой грубой сетке $\gamma = 1.5$. В результате были получены зависимости энергии деформаций мембраны от расстояния между двумя цилиндрическими трансмембранными пептидами.

190

В одномерном приближении в предположении о трансляционной симметрии системы вдоль оси *Оу* все деформации зависят только от координаты *x*, и функционал упругой энергии (3) может быть переписан в следующем виде:

$$W = \int dS \left\{ \frac{B}{2} \left[\frac{dn}{dx} + J_0 \right]^2 - \frac{B}{2} J_0^2 + \frac{K_t}{2} \left[n - \frac{dH}{dx} \right]^2 + \frac{\sigma}{2} \left[\frac{dH}{dx} \right]^2 + \frac{K_a}{2h^2} \left[h - \frac{h^2}{2} \frac{dn}{dx} - H \right]^2 \right\},$$
(6)

где $n = n_x$ — проекция директора на ось *Ox*. Вариация этого функционала по функциям n(x) и H(x) приводит к двум линейным уравнениям Эйлера– Лагранжа:

$$\left(\frac{B}{K_t} + \frac{K_a h^2}{4K_t}\right) n'' - n + \left(1 + \frac{K_a}{2K_t}\right) H' = 0,$$

$$h\left(1 + \frac{\sigma}{K_t}\right) H'' - \frac{K_a}{hK_t} H - h\left(1 + \frac{K_a}{2K_t}\right) n'' + \frac{K_a}{K_t} = 0,$$
(7)

где штрих обозначает производную по координате x. Из первого уравнения выражается H' через nи n''. Второе уравнение дифференцируется один раз по x, и в получившееся уравнение подставляется H', выраженное из первого уравнения. В результате получается изолированное линейное уравнение на n(x) четвертого порядка:

$$h^{2} (4l^{2} + Ah^{2}) n^{(4)} + + 4 (Ah^{2} - Al^{2} - h^{2}s) n'' + An = 0,$$
(8)

где $A = K_a/K_t$; $l^2 = B/K_t$; $s = \sigma/K_t$. Общее решение этого уравнения записывается в виде:

$$n(x) = c_1 e^{qx} + c_2 e^{-qx} + c_3 e^{px} + c_4 e^{-px}, \qquad (9)$$

где c_1, c_2, c_3, c_4 — постоянные комплексные коэффициенты, которые следует определить из граничных условий,

$$q = \sqrt{\frac{2\left(Al^{2} + h^{2}s - Ah^{2} - \sqrt{A^{2}\left(l^{4} - 2l^{2}h^{2} - h^{4}s\right) - 2Ah^{2}\left(h^{2}s + l^{2}s + 2l^{2}\right) + h^{4}s\right)}{h(1+s)(4l^{2} + Ah^{2})}},$$

$$p = \sqrt{\frac{2\left(Al^{2} + h^{2}s - Ah^{2} + \sqrt{A^{2}\left(l^{4} - 2l^{2}h^{2} - h^{4}s\right) - 2Ah^{2}\left(h^{2}s + l^{2}s + 2l^{2}\right) + h^{4}s\right)}{h(1+s)(4l^{2} + Ah^{2})}}.$$
(10)

Решение n(x) в виде (9) подставляем в первое уравнение системы (7), откуда, интегрируя по x, находим решение H(x) в виде:

$$H = \frac{4l^2q^2 + Ah^2q^2 - 4}{2q(2+A)} (c_1 e^{qx} - c_2 e^{-qx}) + \frac{4l^2p^2 + Ah^2p^2 - 4}{2p(2+A)} (c_3 e^{px} - c_4 e^{-px}).$$
(11)

Выражения (9) и (11) подставляются в функционал упругой энергии (6). Интегрирование по нейтральной поверхности липидного монослоя позволяет получить аналитическое выражение для упругой энергии мембраны, однако это выражение слишком громоздко и поэтому здесь не приводится.

Четыре комплексных коэффициента c_1 , c_2 , c_3 , c_4 эквивалентны восьми действительным. Однако при наложении условия вещественности функций n(x) и H(x) при любом действительном x остается только четыре независимых действительных

коэффициента, которые следует определить из граничных условий. В одномерном приближении граничные условия ставятся следующим образом:

$$n(L_0/2) = 0, \quad H(L_0/2) = L_p/2, \quad n(0) = 0,$$
 (12)

где L_0 — расстояние между границами трансмембранных пептидов; начало координат расположено посередине между пептидами в точке x = 0(рис. 1). Три граничных условия (12) позволяют найти три неопределенных коэффициента; оставшийся четвертый коэффициент находится путем минимизации по нему полной упругой энергии мембраны. Полученная зависимость упругой энергии в одномерном приближении $W(L_0)$ преобразовывалась в энергию взаимодействия пептидов путем вычитания энергии при $L_0 \rightarrow \infty$. Кроме того, для аппроксимации энергии взаимодействия, полученной методом конечных элементов, энергия в одномерном приближении приводилась к тому же аргументу, т.е. к расстоянию между центрами пептидов, а не расстоянию между их границами. Окончательно энергия вза-

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 39 № 3 2022

имодействия пептидов в одномерном приближении получалась в следующем виде:

$$w(L) = W(L_0 - 2r_0) - W(\infty) = W(L) - W(\infty).$$
(13)

Рассчитанная методом конечных элементов энергия взаимодействия аппроксимировалась энергией в одномерном приближении согласно соотношению:

$$w_0 = D_{\rm eff} w(\alpha L + \beta), \qquad (14)$$

где $D_{\rm eff}$ — эффективный "деформационный" диаметр трансмембранного пептида, α и β — коэффициенты, учитывающие изменения характерных длин деформаций в одномерном приближении по сравнению с реальной низкосимметричной системой. Аппроксимация проводилась методом наименьших квадратов, однако расчетные точки, соответствующие малым расстояниям между пептидами, брались с уменьшенным в 10 раз весом, поскольку при малых расстояниях в области между пептидами теория упругости сплошной среды, вообще говоря, неприменима.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Расчеты энергии деформаций мембраны, индуцированных двумя трансмембранными цилиндрическими пептидами, были проведены при следующих параметрах мембран и пептидов. Длина трансмембранной части пептидов считалась равной $L_p = 3.6$ нм; радиус трансмембранно-го пептида – $r_0 = 0.65$ нм, что приблизительно соответствует радиусу α-спирали. Были рассмотрены бислои четырех различных толщин: 2h = 3.0, 3.2, 4.0, 4.2 нм; при $2h = L_p = 3.6$ нм пептиды не деформируют мембрану. При каждой толщине бислоя были рассмотрены случаи "мягкой" (обозначаемой индексом "s") и "жесткой" (обозначаемой индексом "r") мембран, характеризующихся двумя различными наборами модулей упругости: модули поперечного изгиба $B_s = 10 k_B T [23], B_r =$ $= 5B_s = 50 k_B T$; модули латерального растяжениясжатия $K_s = 133$ мH/м [23], $K_r = 5K_s = 665$ мH/м. Модули гауссовой кривизны и кручения выражались через модуль поперечного изгиба: $K_G = -B/2$ [24], $K_{\rm rot} = B/2$ [12, 22]. Модуль наклона определяется величиной поверхностного натяжения границы раздела вода – гидрофобные цепи липидов и должен слабо зависеть от конкретной химической структуры и состояния липида; он считался равным $K_t = 40 \text{ мH/м}$ [8]. Латеральное натяжение считалось равным $\sigma = 0.1$ мH/м; получаемые результаты слабо зависят от его конкретной величины. Спонтанная кривизна дает постоянный вклад в упругую энергию, не зависящий от расстояния между пептидами [22]. Поскольку мы рассматриваем энергии взаимодействия, отсчитываемые от энергии состояния бесконечно удаленных друг от друга пептидов (см. (13)), постоянные вклады в упругую энергию не учитывались. Функционал упругой энергии (3) минимизировался методом конечных элементов при следующих дискретных расстояниях между центрами пептидов: $L = \{1.4, 1.7, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 11.0, 12.0, 13.0, 14.0, 15.0, 16.0, 18.0, 20.0, 24.0, 28.0\} нм. При аппрокси$ мации расчетные энергии при первых трех расстояниях брались с уменьшенным весом.

Результаты расчетов энергии взаимодействия двух цилиндрических трансмембранных пептидов методом конечных элементов и в рамках одномерного приближения приведены на рис. 2. Значения энергии, полученные численно методом конечных элементов, аппроксимировались кривыми, рассчитанными в одномерном приближении согласно соотношению (14). В случае, когда $L_p = 2h = 3.6$ нм, пептиды не деформируют мембрану и энергия взаимодействия пептидов постоянна и равна нулю. При $L_p \neq 2h$ возникают упругие деформации мембраны, которые опосрелуют латеральное взаимолействие пептилов. При всех значениях параметров пептиды отталкиваются (энергия взаимодействия положительна) на больших расстояниях (L > 4-6 нм) и притягиваются (энергия взаимодействия отрицательна) на малых расстояниях (L < 4 нм) (рис. 2). Индуцируемые пептидами деформации затухают на расстояниях порядка нескольких нанометров, и при L >> 10 нм энергия взаимодействия становится пренебрежимо малой (рис. 2). Таким образом, для сближения пептидов необходимо преодолеть некоторый энергетический барьер, высота которого практически не зависит от жесткости мембраны (ср. соответствующие кривые на рис. 2a и 2δ), но зависит от разности $(L_p - 2h)$. Положение вершины барьера смещается вправо приблизительно на 1 нм при увеличении толщины бислоя с 2h == 3.0 нм до 2h = 4.2 нм (рис. 2).

Из графиков (рис. 2) видно, что одномерное приближение достаточно хорошо описывает взаимодействие цилиндрических трансмембранных пептидов при расстояниях между центрами пептидов $L \ge 2$ нм независимо от жесткости и толщины мембраны. При расстоянии между центрами L = 2 нм расстояние между границами пептидов составляет $L_0 = L - 2r_0 = 0.7$ нм, что приблизительно соответствует латеральному размеру одной липидной молекулы. Применение теории упругости сплошной среды для описания состояния участка мембраны между пептидами при меньших расстояниях между ними, вообще говоря, не вполне корректно, особенно в одномерном приближении. Параметры $D_{\rm eff}$, α и β аппроксимации энергий взаимодействия, полученных численно методом конечных элементов, кривыми,



Рис. 2. Энергии взаимодействия двух цилиндрических трансмембранных пептидов, опосредованного деформациями мембраны: a - в мягкой мембране, $\delta - в$ жесткой мембране. Черные круги соответствуют точкам, полученным численно методом конечных элементов; сплошные кривые получены в одномерном приближении и преобразованы в соответствии с соотношением (14) для аппроксимации результатов численных расчетов. Длина пептида $L_p = 3.6$ нм; толщина гидрофобной части бислоя 2h = 3.0 нм (зеленые кривые); 3.2 нм (синие кривые); 4.0 нм (серые кривые); 4.2 нм (красные кривые). Потенциалы были сдвинуты на постоянную величину ($2k_BT$ – зеленые кривые), $3k_BT$ – синие кривые) для лучшей иллюстрации. Горизонтальные штриховые линии соответствуют расстоянно $L = 2r_0$, при котором пептиды касаются друг друга.

рассчитанными в одномерном приближении согласно соотношению (14), приведены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что параметры аппроксимации D_{eff} и α практически не зависят от толщины бислоя. В настоящей работе мы фиксировали длину трансмембранного пептида ($\hat{L_p} = 3.6$ нм) и варьировали толщину бислоя. Независимость D_{eff} и α от *h* позволяет применять разработанный подход в другой постановке: при фиксированной толщине бислоя можно аналогичным образом рассматривать взаимодействие цилиндрических трансмембранных пептидов различной длины. При увеличении жесткости мембраны в 5 раз параметр α меняется слабо (с ~0.9 до ~1.1), однако $D_{\rm eff}$ уменьшается приблизительно в 2 раза, с ~0.70 до ~0.33. В подходе Дерягина [20] для приближенного расчета энергии взаимодействия кривых поверхностей на основе одномерного приближения эффективная длина l_{eff}, по которой взаимодействуют кривые поверхности, в наших обозначениях определяется выражением:

$$l_{\rm eff} = 2\sqrt{2l_d}r_0,\tag{15}$$

где l_d — характерная длина затухания сил, опосредующих взаимодействие. В табл. 1 приведены значения длин затухания (l_d) и осцилляций (l_o) деформаций мембраны, полученные из (10) как $l_d = 1/|\text{Re}(q)|, l_o = 1/|\text{Im}(q)|$. Из таблицы видно, что $D_{\rm eff}$ не связано напрямую с l_d , например, потому, что l_d сильно зависит от толщины липидного монослоя, в то время как $D_{\rm eff}$ от нее практически не зависит. Таким образом, несмотря на то что одномерное приближение позволяет достаточно точно находить энергии взаимодействия цилиндрических трансмембранных пептидов (рис. 2), эффективный "деформационный" диаметр пептидов $D_{\rm eff}$ не может быть определен в рамках подхода Дерягина согласно соотношению (15). Это, повидимому, связано с тем, что $l_{\rm eff}$ в виде (15) получается в предположении $r_0 \gg l_d$, что в нашем слу-

Таблица 1. Параметры аппроксимации энергий взаимодействия, полученных численно методом конечных элементов, кривыми, рассчитанными в одномерном приближении ($D_{\rm eff}$, α , β). Характерные длины затухания (l_d) и осцилляций (l_o) деформаций мембраны

2 <i>h</i>	Мягкая мембрана				Жесткая мембрана					
	$D_{\rm eff}$	α	β	l_d	l_o	$D_{\rm eff}$	α	β	l_d	lo
3.0	0.69	0.88	0.45	2.25	1.39	0.34	1.09	0.15	1.19	11.7
3.2	0.70	0.88	0.50	2.50	1.44	0.33	1.11	0.16	1.32	3.78
4.0	0.72	0.87	0.72	3.64	1.67	0.32	1.13	0.35	1.94	2.42
4.2	0.72	0.85	0.80	3.96	1.72	0.32	1.13	0.41	2.11	2.38

Примечание. Все длины (h, D_{eff} , β , l_d , l_o) указаны в нанометрах.

193

чае заведомо не выполняется. Кроме того, подход Дерягина был обоснован для монотонно затухающих с расстоянием сил, опосредующих взаимодействие [20], в то время как деформации мембраны затухают и осциллируют, т.е. затухают немонотонно, поскольку $|\text{Im}(q)| = 1/l_o \neq 0$ (табл. 1).

Отметим, однако, что при увеличении жесткости мембраны в 5 раз эффективный "деформационный" диаметр пептидов уменьшился приблизительно в $(0.72/0.32) = 2.25 \approx \sqrt{5}$ раз. причем практически независимо от толшины бислоя. Таким образом, на основании результатов расчетов, приведенных в табл. 1, можно предварительно предположить, что эффективный диаметр пептидов, определяющий их латеральное взаимодействие в одномерном приближении. должен быть обратно пропорционален корню квадратному из жесткости мембраны. При этом наиболее вероятно, что деформацией, определяющей величину D_{eff}, является поперечный изгиб. Модули поперечного изгиба и латерального растяжения-сжатия имеют разную размерность. Для сравнения "жесткостей" этих деформаций необходимо привести их модули к одной размерности. Можно модуль поперечного изгиба разделить на квадрат характерного параметра липидного монослоя, имеющего размерность длины, т.е., например, на его толщину *h*. Тогда $B/h^2 \approx (10 \ k_{\rm B}T)/(2 \ {\rm HM})^2 =$ = 0.625 $k_{\rm B}T$ /нм², в то время как K_a = 133 мН/м ≈ ≈ 32 $k_{\rm B}T$ /нм², т.е. $K_a \gg B/h^2$. Таким образом, деформация латерального растяжения-сжатия значительно более "жесткая", и ее энергия, соответственно, существенно меньше, чем энергия деформации поперечного изгиба.

Таким образом, в настоящей работе мы обосновали применение одномерного приближения для расчета энергии взаимодействия цилиндрических трансмембранных пептидов в липидных бислоях различной толщины и жесткости. Величины энергии, рассчитанные в одномерном приближении, значительно отклоняются от точных значений, когда расстояние между границами пептидов становится меньше латерального размера липидной молекулы. Однако в таких условиях применение теории упругости сплошной среды в целом не вполне корректно. При больших расстояниях между пептидами одномерное приближение достаточно хорошо воспроизводит результаты точного (численного) расчета. Эффективный "деформационный" диаметр трансмембранного пептида практически не зависит от толщины бислоя и, по-видимому, обратно пропорционален корню квадратному из модуля поперечного изгиба.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00834).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kozlovsky Y., Kozlov M.M. 2003. Membrane fission: Model for intermediate structures. *Biophys. J.* 85, 85–96.
- Martens S., Kozlov M.M., McMahon H.T. 2007. How synaptotagmin promotes membrane fusion. *Science*. 316, 1205–1208.
- 3. Chernomordik L., Kozlov M.M., Zimmerberg J. 1995. Lipids in biological membrane fusion. *J. Membr. Biol.* **146**, 1–14.
- Kozlovsky Y., Kozlov M.M. 2002. Stalk model of membrane fusion: Solution of energy crisis. *Biophys. J.* 82, 882–895.
- 5. Pannuzzo M., McDargh Z.A., Deserno M. 2018. The role of scaffold reshaping and disassembly in dynamin driven membrane fission. *Elife.* **7**, e39441.
- Kozlovsky Y., Chernomordik L.V., Kozlov M.M. 2002. Lipid intermediates in membrane fusion: Formation, structure, and decay of hemifusion diaphragm. *Biophys. J.* 83, 2634–2651.
- 7. Helfrich W. 1973. Elastic properties of lipid bilayers: Theory and possible experiments. *Z. Naturforsch. C.* 28, 693–703.
- 8. Hamm M., Kozlov M.M. 2000. Elastic energy of tilt and bending of fluid membranes. *Eur. Phys. J. E.* **3**, 323–335.
- 9. Terzi M.M., Deserno M. 2017. Novel tilt-curvature coupling in lipid membranes. J. Chem. Phys. 147, 084702.
- Pinigin K.V., Kuzmin P.I., Akimov S.A., Galimzyanov T.R. 2020. Additional contributions to elastic energy of lipid membranes: Tilt-curvature coupling and curvature gradient. *Phys. Rev. E.* 102, 042406.
- Kondrashov O.V., Galimzyanov T.R., Pavlov K.V., Kotova E.A., Antonenko Y.N., Akimov S.A. 2018. Membrane elastic deformations modulate gramicidin A transbilayer dimerization and lateral clustering. *Biophys. J.* 115, 478–493.
- 12. Kondrashov O.V., Galimzyanov T.R., Jiménez-Munguía I., Batishchev O.V., Akimov S.A. 2019. Membrane-mediated interaction of amphipathic peptides can be described by a one-dimensional approach. *Phys. Rev. E.* **99**, 022401.
- Perrin Jr. B.S., Fu R., Cotten M.L., Pastor R.W. 2016. Simulations of membrane-disrupting peptides II: AMP piscidin 1 favors surface defects over pores. *Biophys. J.* 111, 1258–1266.
- Chen C.H., Wiedman G., Khan A., Ulmschneider M.B. 2014. Absorption and folding of melittin onto lipid bilayer membranes via unbiased atomic detail microsecond molecular dynamics simulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1838, 2243–2249.
- 15. Bories F., Constantin D., Galatola P., Fournier J.B. 2018. Coupling between inclusions and membranes at the nanoscale. *Phys. Rev. Lett.* **120**, 128104.
- Lin X., Gorfe A.A., Levental I. 2018. Protein partitioning into ordered membrane domains: Insights from simulations. *Biophys. J.* 114, 1936–1944.
- Park S., Yeom M.S., Andersen O.S., Pastor R.W., Im W. 2019. Quantitative characterization of protein– lipid interactions by free energy simulation between binary bilayers. J. Chem. Theor. Comput. 15, 6491–6503.

- Молотковский Р.Ю., Акимов С.А. 2009. Расчет линейного натяжения в различных моделях кромки поры в липидном бислое. Биол. мембраны. 26, 149– 158.
- Карпунин Д.В., Акимов С.А., Фролов В.А. 2005. Формирование пор в плоских липидных мембранах, содержащих лизолипиды и холестерин. Биол. мембраны. 22, 429–432.
- Israelachvili J. 2011. Intermolecular and Surface Forces. New York: Academic Press, ISBN 9780123919274.
- Nagle J.F., Wilkinson D.A. 1978. Lecithin bilayers. Density measurement and molecular interactions. *Biophys. J.* 23, 159–175.
- 22. Kondrashov O.V., Akimov S.A. 2022. Regulation of antimicrobial peptide activity via tuning deformation fields by membrane-deforming inclusions. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 326.
- Rawicz W., Olbrich K.C., McIntosh T., Needham D., Evans E. 2000. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* 79, 328–339.
- 24. Hu M., de Jong D.H., Marrink S.J., Deserno M. 2013. Gaussian curvature elasticity determined from global shape transformations and local stress distributions: A comparative study using the MARTINI model. *Faraday Discuss.* **161**, 365–382.

Lateral Interaction of Cylindrical Transmembrane Peptides in a One-Dimensional Approximation

O. V. Kondrashov¹, S. A. Akimov^{1, *}

¹Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia *e-mail: akimov sergey@mail.ru

Various membrane inclusions can induce deformations of lipid bilayer membranes. The characteristic length of deformation propagation along the membrane is about several nanometers. Overlapping of deformations induced by different membrane inclusions leads to their effective lateral interaction. The interaction energy can be calculated within the framework of an adequate theory of elasticity. However, in practice, such a calculation can be carried out in an analytical form only for effectively one-dimensional systems, for example, those with translational or rotational symmetry. In the general case of systems with low symmetry, the problem cannot be solved analytically. We theoretically considered the interaction of two cylindrical transmembrane peptides mediated by membrane deformations. The interaction energies were obtained by numerical minimization of the elastic energy functional. In addition, we calculated the interaction energies in a one-dimensional approximation, assuming that the system possesses the translational symmetry. It was shown that the one-dimensional approximation quite well reproduces the results of exact numerical calculations in lipid bilayers of various thicknesses and rigidities.

Keywords: lipid membrane, elasticity theory, transmembrane peptide, lateral interaction

УДК 577.352.4

ИЗМЕНЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОПЛАСТОВ В СВЯЗИ С ВОЗБУДИМОСТЬЮ КЛЕТОК *СНАRA* И ПЕРЕНОСОМ МЕТАБОЛИТОВ В ПОТОКЕ ЦИТОПЛАЗМЫ

© 2022 г. А. А. Булычев^{а, *}, А. В. Алова^а

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия *e-mail: bulychev@biophys.msu.ru Поступила в редакцию 13.12.2021 г. После доработки 18.01.2022 г. Принята к публикации 18.01.2022 г.

Распространение потенциала действия и перенос метаболитов с потоком цитоплазмы составляют основные способы дальней сигнализации в гигантских клетках харовых водорослей. В работе показано, что возбуждение плазматических мембран и остановка течения цитоплазмы в междоузлиях *Chara* на слабом свету (при отсутствии масштабных изменений pH на поверхности клетки) сопровождаются переходным возрастанием или серией колебаний фактической флуоресценции хлорофилла (F) в хлоропластах, лежащих вблизи зон наружной кальцификации, но не оказывают влияния на свечение хлоропластов в преобладающих по площади некальцифицированных участках. Разная чувствительность к генерации потенциала действия у хлоропластов, лежащих вблизи и вдали от зон инкрустации, вероятно связана со структурными и биохимическими различиями клеточных доменов и влиянием течения цитоплазмы на окружение хлоропластов в области измерения. Кинетические кривые изменений F при возбуждении клетки и число отдельных полос в ответной реакции зависели от освещаемой площади препарата. Число полос сокращалось при переходе от общего освещения к освещению узкого участка клетки световодами с диаметром 2.0 и 0.4 мм. Результаты свидетельствуют о том, что начальные стадии изменений F^{*} после генерации потенциала действия обусловлены внутренними процессами в хлоропластах, а более поздние изменения F связаны с поступлением метаболитов из возобновляющегося потока цитоплазмы в хлоропласты исследуемой зоны. Амплитуда вызванных возбуждением изменений F резко снижалась в начальный период после перехода от общего к локальному освещению, что объясняется потреблением восстановительных эквивалентов цитоплазмы в процессах постсветовой фиксации СО₂ в условиях прекращения фотопродукции NADPH в области затенения.

Ключевые слова: Characeae, потенциал действия, флуоресценция хлорофилла, течение цитоплазмы, транспортеры оболочки хлоропластов, дальний транспорт DOI: 10.31857/S0233475522030033

введение

Возбудимость представляет одно из фундаментальных свойств живых клеток. Генерация потенциала действия (ПД) в клетках растений сопровождается повышением уровня Ca²⁺ в цитоплазме, что оказывает влияние на синтез фитогормонов [1], приводит к закрыванию листьев у сейсмочувствительных и насекомоядных растений [2, 3], вызывает изменения дыхания и фотосинтеза [4, 5]. Влияние возбудимости на фотосинтез отчетливо проявляется по изменениям флуоресценции (Фл) хлорофилла (Хл) в междоузлиях харовых водорослей на ярком свету, при котором на поверхности клетки поддерживаются чередующиеся кислые и щелочные зоны с перепадами рН от 6.5 до 10 [6, 7]. Генерация ПД вретакже снижала квантовую эффективность фотосистемы II (ФСІІ) и линейный поток электронов в области щелочных зон, но оказывала слабое влияние на хлоропласты, расположенные под наружными кислыми зонами [8]. Показано, что наблюдаемое снижение максимальной флуоресценции F'_m обусловлено возрастанием ΔpH на тилакоидных мембранах освещенных хлоропластов и усилением тепловых потерь в антенне (нефотохимическое тушение) после генерации ПД [6]. Неоднородный профиль pH в клетках *Chara* исчезает в темноте, но пространственная неоднородность в распределении некоторых органелл (хара-

сомы) [9] сохраняется в течение 7–10 сут. Еще бо-

лее устойчивы к долгому затенению кристаллы

менно устраняла эти неравновесные структуры, а

солей кальция на поверхности клеточной стенки, которые осаждаются на свету в области наружных щелочных зон. Сведения о влиянии возбудимости на фотосинтез и Фл Хл в клетках *Chara* на слабом свету в условиях сглаживания продольного профиля наружного pH в настоящее время отсутствуют.

При низкой освешенности, недостаточной для развития нефотохимического тушения (NPQ), влияние возбуждения плазматических мембран на хлоропласты может включать регуляторные пути, основанные на изменении редокс-состояния пула пластохинонов (PQ) и первичного хинонного акцептора ФСІІ Q_A. Сведения о влиянии возбудимости мембран на состояние переносчиков электронов между фотосистемами остаются пока единичными. На листьях венериной мухоловки обнаружено переходное возрастание фактической флуоресценции хлорофилла (F, F или F_t в разных обозначениях) после индукции ПД при низкой интенсивности света, что указывает на временное восстановление Q_A и пула PQ [10, 11]. В условиях слабого стационарного освещения (при отсутствии NPQ), когда значения максимальной и минимальной флуоресценции F'_{m} и F_{o} поддерживаются на постоянном уровне, изменения флуоресценции F' служат удобным показателем фотохимического тушения q_P в ФСІІ. Возрастание F' отражает восстановление Q_A и увеличение доли закрытых реакционных центров, а снижение F' соответствует увеличению содержания окисленной формы Q_A. Сглаживание неоднородного профиля рН в примембранных слоях среды при низких интенсивностях света исключает масштабные изменения наружного рН в качестве переменной величины и упрощает интерпретацию процессов, запускаемых в хлоропластах при возбуждении.

Влияние ПД на фотосинтетическую функцию включает два важных фактора. Повышение концентрации Ca²⁺ в цитоплазме харовых водорослей при генерации ПД (от 0.1 до 10-40 мкМ) [12, 13] сопровождается светозависимым поглощением Ca²⁺ хлоропластами и возрастанием уровня Ca²⁺ в строме [14], что ведет к подавлению фотосинтетической фиксации СО₂ [15]. Кроме того, влияние ПД на активность хлоропластов включает еще одно, ранее не включенное в обсуждение обстоятельство. Повышение уровня Ca²⁺ в цитозоле во время потенциала действия вызывает временную остановку течения цитоплазмы [16], что вероятно модифицирует обмен веществ между хлоропластами и цитоплазмой, а также концентрации метаболитов в потоке жидкости. Эти события могут проявляться в дальних межхлоропластных взаимодействиях, опосредованных круговым течением цитоплазмы. Изучение индуцируемых потенциалом действия изменений F позволит понять, как сказывается временное прерывание течения цитоплазмы на распределении метаболитов, доставляемых с потоком к исследуемым хлоропластам.

О существовании дальних опосредованных циклозом взаимодействий между неподвижными хлоропластами в гигантских клетках Chara говорят резкие различия индукционных кривых Фл Хл в условиях освещения всего междоузлия в сравнении с освещением небольшого (диаметр ~2 мм) участка клетки, а также исчезновение этих различий после остановки течения цитоплазмы под действием ингибитора актина цитохалазина D [17, 18]. Аналогичный подход – сравнение ответных реакций хлоропластов на генерацию ПД в условиях общего и локального освещения - может оказаться полезным для выявления дальних внутриклеточных взаимодействий, участвующих в передаче сигнала от возбудимых мембран к фотосинтетическому аппарату.

В данной работе изучали влияние генерации потенциала действия на изменения Фл Хл в клетках междоузлий харовой водоросли, экспонированных на слабом свету, достаточном для поддержания фотосинтетического аппарата в активном состоянии. Наряду со стационарным фоновым освещением всей клетки, использовали длительное (>10 мин) локальное освещение небольшого участка, которое сопровождается инактивацией светозависимых транспортеров оболочки у хлоропластов, расположенных вне освещаемой области. В итоге выявлена неоднородность ответных реакций хлоропластов разных участков клетки на генерацию ПД и установлена важная роль транспортеров оболочки и микрофлуидного транспорта в динамике изменений редокс-состояния фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) при возбуждении плазматических мембран.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Эксперименты проводили на клетках междоузлий Chara australis R. Br. Водоросли выращивали при рассеянном комнатном освещении. Использовали боковые побеги длиной 25–30 мм и диаметром 0.7–0.9 мм, а также закончившие рост клетки центральной оси длиной до 5 см, которые помещали в искусственную прудовую воду, содержащую 0.1 мМ KCl, 1 мМ NaCl и 0.1 мМ CaCl₂. Значения рН среды доводили до рН 7.0 добавлением раствора бикарбоната натрия. Изолированные клетки выдерживали в искусственной прудовой воде не менее суток после отрезания соседних междоузлий. Некоторые особенности строения клеток Chara – наличие зон кальцификации клеточной стенки, ротационное течение цитоплазмы, плотная однослой-


Рис. 1. Микрофотографии сегментов междоузлия *Chara* и варианты освещения клетки в ходе эксперимента. Стрелками отмечены встречные направления течения цитоплазмы по разные стороны от линии разделения потоков (узкая полоса цитоплазмы, не содержащая хлоропластов).

a — Расположение кальцифицированных и свободных от кристаллов участков на поверхности клетки *Chara*. Окружностями *1* и *2* отмечены области измерения флуоресценции хлоропластов вдали от мест отложения кристаллов CaCO₃ и на границе с кристаллами соответственно. Верхняя и нижняя части рисунка соответствуют режимам общего освещения всей клетки (*I*) и локального освещения выбранного участка клетки (*II*) при затемнении остальных частей клетки. Исходное изображение предоставлено профессором Ilse Foissner (Университет г. Зальцбурга, Австрия). δ — Участок плотно упакованного слоя хлоропластов на границе зоны отложения кристаллов. Круговые области *1* и *2* соответствуют выбору мест измерения флуоресценции на разном удалении от кристаллов.

ная упаковка неподвижных хлоропластов – представлены на рис. 1.

Микрофлуориметрия хлорофилла. Выход фактической флуоресценции хлорофилла *F* измеряли на микроучастке клеток (диаметр ~100 мкм) с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 25-CFL (Zeiss, Германия), оборудованного микрофлуориметром с импульсно-модулированным освещением Microscopy-PAM (Walz, Германия). Перед измерениями препарат адаптировали к слабому фоновому свету, направленному от верхнего осветителя микроскопа через сине-зеленый фильтр (C3C-22, толщина 5 мм) и нейтральный стеклянный светофильтр (плотность потока квантов на уровне объекта ~10 мкмоль м⁻² с⁻¹, $\lambda < 580$ нм). Низкая интенсивность освещения достаточна для поддержания светозависимых ферментов в активном состоянии, но исключает энергозависимое нефотохимическое тушение. Выход модулированной флуоресценции хлорофилла *F* регистрировали при непрерывном фоновом освещении. Сигнал, поступающий с фотоумножителя, обрабатывали в программе WinControl-3 (Walz), оцифровывали с интервалом ~51 мс аналого-цифровым преобразователем PCI-6024E (National Instruments, США) и записывали на

компьютер. Измерения проводили при температуре 21–23°С.

Локальное освещение. Для локального освещения области измерения F и окружающих участков использовали гибкий оптоволоконный кабель длиной 10 см с диаметром оптического пучка 2 мм [18, 19]. Один конец оптического кабеля проходил через светозащитный экран; на него падал свет от верхнего осветителя микроскопа. Другой конец кабеля был направлен на клетку сверху. Положение торца оптического кабеля относительно области измерения Фл в горизонтальной плоскости и по вертикали регулировали с помощью микроманипулятора при наблюдении в микроскоп. Для большего сужения освещаемой области препарата применяли одноволоконный кварцевый световод с диаметром 0.4 мм. Интенсивности света, падающего на исследуемую область клетки в режимах общего и локального освещения, отличались незначительно, о чем говорят близкие измеряемые значения F для этих экспериментальных условий.

Электростимуляция. Изолированную клетку междоузлия помещали в двухсекционную камеру из оргстекла. Стимулирующие токовые Ag/AgCl электроды располагались в разных отсеках камеры. Пропускание импульса электрического тока (10 мкА, 150 мс) между наружными электродами вызывало возбуждение клетки и временное прекращение течения цитоплазмы. Остановку внутриклеточного потока под влиянием ПД проверяли во всех опытах визуально в проходящем свете. Для этого измерения Фл Хл временно прерывали в начале каждой отдельной записи. Последействие однократного электрического возбуждения на эффективный квантовый выход ФСІІ продолжается от 10 до 45 мин [6]. В данной работе интервалы между возбуждающими стимулами составляли 10-15 мин. Наружный рН возле кальцифицированных и некальцифицированных участков клеток измеряли с помощью сурьмяных рН-микроэлектродов в стеклянной изоляции, как описано ранее [20].

Усредненные кинетические кривые изменения F, показанные на рисунках, получены при 2—5-кратном воспроизведении в репрезентативных экспериментах на отдельных клетках. В каждой серии экспериментов использовали не менее четырех клеток. Количество измерений указано в подписях к рисункам.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Возрастание *F* в хлоропластах вблизи зон кальцификации после генерации ПД. Приложение короткого импульса электрического тока между частями клетки, находящимися в разных отсеках экспериментальной камеры, вызывало генерацию потенциала действия (ПД), что проявлялось в резкой остановке течения цитоплазмы. Возобновление потока питоплазмы начинается примерно через 30 с после генерации спайка, а полное восстановление скорости течения достигается в течение 10-15 мин [21]. Опыты, проведенные на кальцифицированных и свободных от кристаллов участках клеток, выявили качественно различную чувствительность флуоресценции хлоропластов F' к генерации ПД. В областях, далеких от зон отложения кальциевых кристаллов и занимающих подавляющую часть поверхности клетки, возбуждение плазматических мембран при слабом фоновом освещении (10 мкмоль $m^{-2} c^{-1}$) не оказывало влияния на уровень Фл Хл (рис. 2а). Вместе с тем, в участках, расположенных вблизи кальциевых отложений, генерация ПД вызывала временное повышение Фл хлоропластов и последующее ее снижение до исходного уровня (рис. 26, 2в). При выдерживании клеток в темноте генерация ПД не вызывала изменений флуоресценции *F*. Переходные изменения Фл Хл проявлялись наиболее ярко в хлоропластах, омываемых потоком цитоплазмы на выходе из зоны инкрустации. На противоположной стороне инкрустированной зоны, где цитоплазма поступала в область кальцификации, изменения Фл Хл после генерации ПД были небольшими или отсутствовали.

На рис. 26 и 2в показаны типичные изменения флуоресценции F', вызванные генерацией потенциала действия в условиях общего и локального освещения клеток Chara светом слабой интенсивности (10 мкмоль м $^{-2}$ с $^{-1}$). Измерения проводили на свободных от кристаллов участках клетки, граничащих с зонами кальцификации. При общем стационарном освещении активность светозависимых транспортеров оболочки хлоропластов, отвечающих за накопление Ca²⁺ в строме и перенос восстановительных эквивалентов, сохраняется в пределах всей клетки, а в случае локального освещения активность транспортеров ограничена освещаемой зоной. Как видно из рис. 26 и 26, пиковые значения F' после генерации ПД достигались раньше при узком диаметре светового луча (кривые 2), чем при широком поле облучения (кривые 1). Кроме того, при общем освещении возврат F' к исходному уровню продолжался существенно дольше, чем при локальном освещении области измерения и примыкающих участков. Эти наблюдения позволяют предполагать, что ответные изменения F' после генерации ПД при общем освещении представляют собой суперпозицию нескольких процессов разной природы.

Повышение *F* после генерации ПД, по-видимому, вызвано подъемом уровня Ca²⁺ в строме освещенных хлоропластов [14] и подавлением фиксации CO₂ [15]. Падение потребления NADPH в реакциях цикла Кальвина понижает содержание акцептора NADP⁺, что замедляет отток электронов от Φ CI, способствуя восстановлению РО и Q₄ фотосистемой II и повышению флуоресценции Г'. Известно, что медленные стадии индукционных изменений Фл Хл в фотосинтезируюших организмах тесно связаны с использованием NADPH в метаболических процессах [22]. Установлено также, что электроны поступают от NADPH и восстановленного ферредоксина в пул РО по сегментам шиклической цепи (по антимицин А-чувствительному и антимицин-нечувствительному путям) [23], что также повышает уровень F'. Параллельно с этим избыток NADPH удаляется из стромы в цитоплазму посредством транспортеров оболочки ("малатный клапан" и переносчик триозофосфатов) [24, 25].

Отмечая замедленный спад F на кривых 1 в сравнении с кривыми 2 на рис. 26 и 26, следует учитывать, что площадь освещаемой области препарата определяет длину участка клетки, где происходит экспорт восстановителей из освещенных хлоропластов после временной остановки циклоза. При общем освещении содержание восстановительных эквивалентов в цитоплазме повышается в широкой области по всей клетке, тогда как при локальном освещении область повышенного содержания восстановителей в цитоплазме не выходит за пределы освешаемой зоны. Поэтому в период возобновления циклоза после ПД поступление восстановителей из цитоплазмы в строму анализируемых хлоропластов занимает более длительное время в условиях общего, а не локального освешения.

После генерации ПД при общем освещении всей клетки часто наблюдалось начальное снижение уровня F' (рис. 2e, кривая I). Появление этой стадии указывает на то, что редокс состояние стромы анализируемых хлоропластов контролируется составом цитоплазмы, поступающей с потоком в зону измерения Фл Хл из области кальциевых отложений, где фиксация CO₂ заторможена. Остановка течения цитоплазмы нарушает микрофлуидную регуляцию, в результате чего редокссостояние стромы временно смещается на новый уровень за счет диффузии и биохимических реакций.

Генерация ПД выявляет неоднородное продольное распределение фотометаболитов. Различия в кинетике изменений F', вызванных потенциалом действия в условиях общего и локального освещения клетки лучами равной интенсивности (рис. 2) дают основания полагать, что изменения F' имеют комплексную природу и обусловлены как внутренними процессами, протекающими в хлоропластах при повышении уровня Ca²⁺ в строме, так и обменом фотометаболитов между по-



Рис. 2. Различия ответных изменений флуоресценции F' хлорофилла Chara australis при генерации потенциала действия (ПД) в участках разной локализации: (*a*) вдали (> 3 мм) от зон кальцификации клеточных стенок; (δ , ϵ) на границе с зонами отложения наружных кристаллов кальция. а – Отсутствие влияния ПД на F в зонах без инкрустации при низкоинтенсивном освещении (10 мкмоль $m^{-2} c^{-1}$) всего междоузлия; представлены усредненные записи для пяти клеток. б и в – Примеры вызванных возбуждением изменений F при аналогичном освещении всего междоузлия (кривые 1) и небольшого (Ø 2 мм) участка клетки (кривые 2) на границе с зоной отложения кристаллов кальция. В части б представлены усредненные кривые F и стандартные ошибки для n = 2-3, а в части θ – усредненные кривые для n = 8-9. Стрелками отмечены моменты пропускания электрического тока (~10 мкА, 150 мс), вызывающие генерацию ПД и временную остановку течения цитоплазмы.



Рис. 3. Колебания F', вызванные генерацией ПД в условиях освещения (*a*) всей клетки и (δ) участка клетки диаметром 2 мм. *a*: 1 – поддержание F на стационарном уровне в покое без приложения возбуждающего стимула; 2 – мультифазные изменения F, вызванные генерацией ПД. δ – Изменения F в ответ на генерацию ПД при разных расстояниях от места поступления цитоплазмы в освещаемую зону до области измерения F: 1 – на удалении 1 мм, 2 – на расстоянии 0.5 мм. Стрелками отмечены моменты приложения возбуждающего электрического стимула. Результаты *a* и δ получены при измерениях на одном и том же участке клетки.

движной цитоплазмой и стромой хлоропластов. В зависимости от физиологического состояния клеток и экспериментальных условий эти процессы могут перекрываться в большей или меньшей степени. В пользу этого предположения говорит регистрация нескольких компонент в изменениях *F* после генерации ПД (рис. 3).

При экспозиции интернодальной клетки на слабом непрерывном свету уровень флуоресценции F в покое не претерпевал заметных изменений (рис. 3a, кривая I). Однако электрическая стимуляция клетки запускала переходные процессы, при которых сигнал F менялся во времени колоколообразно и нередко в виде серии колебаний (рис. 3a, кривая 2). Существенно, что число наблюдаемых колебаний F сокращалось при сужении освещаемой площади препарата (рис. 36). При переходе от общего освещения клетки к стационарному воздействию узким (диаметром 2 мм) лучом той же интенсивности и того же спектрального состава число осцилляций в ответной реакции F' на возбуждение уменьшалось от 3-4 до двух. Кроме того, вторая полоса в серии из двух осцилляций дополнительно ослаблялась при сужении освещаемой области, из которой поступала "облучаемая" цитоплазма в зону измерения флуоресценции (кривые 1 и 2 на рис. 36). Такое сужение дистанции достигалось путем смещения положения световода, а не области измерения *F*. При локальном освещении оптоволокном более узкого диаметра (0.4 мм) ответные изменения Г на возбуждение включали лишь один максимум, достигаемый через 50-80 с после генерации ПД. Зависимость числа колебаний F от размера освещаемой части клетки указывает на то, что второе и последующие колебания обусловлены дальними межхлоропластными взаимодействиями, а именно доставкой восстановительных эквивалентов в хлоропласты анализируемой зоны из соседних освещенных участков клетки. По-видимому, прекращение циклоза усиливает неоднородность продольного распределения восстановительных эквивалентов в цитоплазме, что проявляется в образовании чередующихся пиков Г (рис. 3а, кривая 2). Это контрастирует с отсутствием изменений на записи F от времени при стационарной скорости течения цитоплазмы (рис. 3*a*, кривая *1*).

Зависимость индушированных изменений F от состояния транспортеров оболочки. Для выявления роли транспортеров оболочки пластид в ответных реакциях F на генерацию ПД интернодальную клетку помещали в темноту, оставляя фоновое освещение лишь на узком (диаметром 2 мм) участке, по центру которого располагалась область регистрации Фл Хл. Результаты более ранней работы позволяют предполагать, что перенос клетки в темноту сопровождается временным понижением содержания восстановительных эквивалентов в цитоплазме [19], так как ферменты цикла фиксации СО₂ и транспортеры редокс-соединений сохраняют активность на протяжении до десятков секунд в темноте и обеспечивают постсветовую ассимиляцию углекислоты. Как показано на рис. 4, генерация ПД через 2 мин после перехода от общего к локальному освещению не оказывала влияния на уровень Фл хлоропластов. Вместе с тем, в условиях стационарного локального освещения (15-60 мин) возбуждение клетки вызывало переходные изменения F, которые в данном случае включали две волны возрастания свечения. Полученные результаты дополнительно подтверждают предположение о том, что смена общего на локальное освещение клетки Chara сопровождается временным подавлением дальней сигнализации между хлоропластами и последующим возобновлением передачи сигналов при переходе к новому стационарному режиму [19].

ОБСУЖЛЕНИЕ

Результаты данной работы показывают, что наличие шелочных зон с рН 10-10.5 на поверхности освешенных клеток Chara не является необходимым условием для трансформации электрического сигнала плазматической мембраны, приводящей к изменению состояния фотосинтетических мембран. Вместе с тем, ответные реакции *F*' хлоропластов на возбуждение плазмалеммы проявлялись преимущественно вблизи участков наружной кальцификации, т.е. в местах возникновения наружных щелочных зон на свету повышенной интенсивности, и отсутствовали в фотосинтетически активных зонах, свободных от кристаллов кальция. Несмотря на отсутствие высокоамплитудных сдвигов рН на поверхности клетки в условиях слабого освещения, рН в области расположения кристаллов был на 0.5-0.75 ед. выше (вследствие гидратации CaCO₃), чем на поверхности некальцифицированных участков и в объеме раствора. Известно, что смещение наружного рН в щелочную сторону повышает проводимость плазмалеммы для H⁺ или OH⁻, увеличивая входящий поток H⁺ (или выход OH⁻) [26], что может вызывать подкисление цитоплазмы. Поэтому вполне вероятно, что хлоропласты, лежащие вблизи кристаллов кальция и вдали от них, окружены цитоплазмой с неравными уровнями рН, причем повышенные значения рН стромы более благоприятны для фиксации СО₂.

Известно также, что участки под зонами инкрустации отличаются от свободных областей отсутствием харасом - особых органелл, представляющих собой инвагинации плазмалеммы, обогащенные H⁺-ATP-азой [9]. Значительное преобладание харасом и Н⁺-насосов в зонах, лишенных кристаллов, и их отсутствие в местах отложения нерастворимых солей кальция может вносить дополнительный вклад в неравномерное распределение H⁺ в цитоплазме по длине междоузлий. Структурные и биохимические различия кальцифицированных и свободных от кристаллов областей, по-видимому, лежат в основе неодинаковых реакций хлоропластов в этих зонах на генерацию ПД. Участки с высоким содержанием харасом, соответствующие наружным кислым зонам, отличаются повышенным уровнем Са²⁺-связывающих белков в мембранных фракциях [27], что может сглаживать изменения [Ca²⁺] в цитоплазме таких доменов во время потенциала действия. С другой стороны, во фракции мембран щелочных (кальцифицированных) участков выявлено повышенное содержание фотосинтетических белков [27], что может определять высокую чувствительность флуоресценции Г' хлоропластов в этих областях к индуцированному возбужлением повышению концентрации Ca²⁺ в цитоплазме.

мула и генерации ПД. Записи 1 и 2 получены для n = 2 и

n = 4 соответственно.

Изменения *F*', вызванные генерацией ПД при общем освещении, часто проявляются в виде размытой полосы с характерной длительностью от 100 до 300 с на уровне половины высоты. Вместе с тем, в кинетике ответа нередко присутствовали локальные минимумы или узкие индивидуальные полосы (рис. 3, 4). Число пиков в изменениях *F*^{*} после генерации ПД сокращалось с уменьшением освещаемой площади препарата. При локальном освещении анализируемой области лучом с диаметром 0.4 мм ответная реакция F включала только один ранний пик. Это говорит о том, что относительно быстрые изменения Г после генерации ПД отражают внутренние процессы в хлоропластах, протекающие в период остановки циклоза до возобновления активного движения цитоплазмы. В отличие от этого, последующие задержанные стадии связаны с восстановлением течения цитоплазмы, переносом фотометаболитов в потоке жидкости и их обменом между подвижной цитоплазмой и неподвижными хлоропластами. Дальние опосредованные течением цитоплазмы взаимодействия в интернодальных клетках Chara отчетливо выявляются по различиям индукционных кривых Фл Хл, вызываемых локальным и общим освещением [17, 18].

Предполагаемая схема влияния ПД на флуоресценцию F' включает нарастание [Ca²⁺] в цитоплазме [12], поступление Ca²⁺ в хлоропласты по механизму светозависимого унипорта [28], подавление фиксации СО₂ [29], сопряженное с по-

520 50 100 150 200 250 300 0 Время, с Рис. 4. Различное влияние генерации ПД на флуоресценцию F после (1) короткого (2 мин) и (2) длительного (>15 мин) затенения всего препарата, за исключением небольшого (Ø 2 мм) участка клетки, экспонируемого на фоновом свету стандартной интенсивности. Стрелкой отмечен момент приложения электрости-



вышением содержания NADPH в строме, торможение в связи с этим линейного потока электронов, а также восстановление РО и QA при переносе электронов от NADPH в пул РО при участии оксидоредуктазы NDH (NAD(P)H-dependent dehydrogenase complex) [22, 23] и антимицин А-чувствительного сегмента циклической ЭТЦ [30]. Одним из элементов рассматриваемой схемы служит экспорт избытка восстановительных эквивалентов в период временного Ca²⁺-зависимого подавления реакций цикла Кальвина. что повышает содержание восстановителей в цитоплазме. После возобновления циклоза восстановительные эквиваленты поступают по градиенту концентрации из обогащенной цитоплазмы в хлоропласты, где содержание NADPH и фотосинтетическая фиксация СО2 нормализуются в связи с удалением избытка Ca2+ посредством Са²⁺/Н⁺-антипорта тилакоидных мембран [15].

Наблюдения нескольких волн возрастания F после генерации ПД говорят о том, что восстановительные эквиваленты, накапливаемые в шитоплазме в период остановки движения цитоплазмы, распределены неравномерно в осевом направлении. В случае их равномерного распределения изменения F' проявляются в виде одной размытой полосы с затянутой стадией спада свечения. У клеток в состоянии покоя уровень фотометаболитов в цитоплазме, по-видимому, также распределен неравномерно, однако в стационарных условиях эта неравномерность остается скрытой. Она выявляется при индуцированной возбуждением остановке цитоплазмы. В частности, начальное снижение F после генерации ПД при общем освещении всей клетки указывает на то, что редокс-состояние хлоропластов вблизи зоны расположения кристаллов кальция при стационарном потоке смещено в сторону избытка восстановителей, но это смещение устраняется при остановке циклоза. Такое объяснение представляется обоснованным, поскольку хлоропласты в зоне инкрустации возможно экспортируют большее количество восстановителей в текущую цитоплазму из-за пониженного содержания доступного CO_2 в области наружных щелочных зон [20]. Таким образом, возбуждение клеточных мембран позволяет выявить неоднородность распределения фотометаболитов по длине клетки. Не исключено также, что временная остановка течения цитоплазмы усиливает неоднородность распределения метаболитов, что проявляется в последовательном возникновении нескольких волн возрастания F' после генерации ПД.

Учитывая положение первого пика *F* во времени на рис. 3 и 4, а также тот факт, что движение цитоплазмы становится заметным лишь через 30 с после генерации ПД, становится очевидным, что первый фронт нарастания *F*, в отличие от последующей волны, происходит в период остановки циклоза. Поэтому первая волна отражает изменение редокс-состояния стромы за счет внутренних процессов в хлоропластах. Предполагая на основе рис. 3 и 4, что вторая волна изменений F достигает пика примерно через 100 с после начала возобновления циклоза, а скорость течения составляет к этому моменту 10 мкм/с при 21°C [21], находим, что за 100-секундный интервал активные метаболиты проходят с потоком расстояние менее 1000 мкм. Таким образом, появление второго максимума F вполне может быть связано с опосредованной циклозом доставкой восстановительных эквивалентов в пределах локально освещенного участка с диаметром 2 мм.

Следует отметить, что переход от общего к локальному освещению междоузлия сопровождался временным понижением Г и сильным подавлением ответных изменений F' после генерации ПД (рис. 4). Ранее показано, что аналогичная смена световых условий вызывает практически полное переходное устранение дальней передачи сигнала, опосредованной течением цитоплазмы [19]. Эти данные интерпретированы как результат совместного действия двух факторов: (1) прекращение образования NADPH в фотореакциях после затенения хлоропластов и (2) временное сохранение активности метаболических транспортеров оболочки хлоропластов и реакций ассимиляции СО₂ после перехода свет-темнота. Сочетание этих факторов вызывает интенсивное поглощение восстановительных эквивалентов цитоплазмы для нужд постсветовой фиксации СО₂ [31]. В этих условиях восстановительные эквиваленты цитоплазмы активно потребляются хлоропластами на границе освещенной и затемненной областей и не достигают с потоком зоны измерения F. Следует отметить, что при генерации ПД через 2-3 мин после перехода от общего к локальному освещению в записях Г' часто отсутствовала первая волна изменений, индуцированных возбуждением. Это может говорить о том, что при активном потреблении NAD(P)Н вне освещаемой зоны и сохранении активности метаболических транспортеров оболочки накопления NADPH в строме не происходит из-за высокой скорости экспорта восстановительных эквивалентов. Это объяснение аналогично интерпретации подавления стадий S-M-T в индукции Фл Хл клеток Chara после перехода от общего к локальному освещению [18].

Подводя итог, следует отметить, что (1) генерация ПД оказывает влияние на Фл хлоропластов, расположенных вблизи кальцифицированных зон, но не оказывает влияния на *F* в преобладающих по размеру некальцифицированных участках; (2) изменения Фл Хл, вызванные генерацией потенциала действия, включают ранние стадии, обусловленные внутренними процессами в хлоропластах, а также задержанные стадии, обусловленные шиклоз-зависимым обменом фотометаболитов между подвижной цитоплазмой и неподвижными хлоропластами; (3) влияние потенциала действия на Фл Хл временно устраняется после перехода от общего освещения клетки к локальному освещению ее небольшого участка, включающего область регистрации F'. Такое нарушение трансформации сигнала связано, вероятно, с усиленным потреблением затененными хлоропластами восстановительных эквивалентов цитоплазмы в период, когда светозависимое образование NADPH прекращается из-за остановки фотосинтетического транспорта электронов, а "малатный клапан" и транслокатор триозофосфатов остаются некоторое время активными в темноте, понижая содержание восстановленных редокс-агентов в цитоплазме.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-54-12015), а также в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Król E., Dziubinska H., Trebacz K. 2010. What do plants need action potentials for? In: *Action potential: biophysical and cellular context, initiation, phases and propagation.* Ed. DuBois M.L. New York: Nova Science, p. 1–26.
- 2. Hagihara T., Toyota M. 2020. Mechanical signaling in the sensitive plant *Mimosa pudica* L. *Plants*. **9**, 1–10.
- 3. Hedrich R., Neher E. 2018. Venus flytrap: How an excitable, carnivorous plant works. *Trends Plant Sci.* 23, 220–234.
- 4. Grams T.E.E., Lautner S., Felle H.H., Matyssek R., Fromm J. 2009. Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf. *Plant, Cell Environ.* **32**, 319–326.
- Sukhov V. 2016. Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants. *Photosynth. Res.* 130, 373–387.
- Krupenina N.A., Bulychev A.A. 2007. Action potential in a plant cell lowers the light requirement for non-photochemical energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* 1767, 781– 788.
- Krupenina N.A., Bulychev A.A., Roelfsema M.R.G., Schreiber U. 2008. Action potential in *Chara* cells intensifies spatial patterns of photosynthetic electron flow and non-photochemical quenching in parallel

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 39 № 3 2022

with inhibition of pH banding. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 681–688.

- Bulychev A.A., Kamzolkina N.A. 2006. Differential effects of plasma membrane electric excitation on H⁺ fluxes and photosynthesis in characean cells. *Bioelectrochemistry*. 69, 209–215.
- 9. Hoepflinger M.C., Hoeftberger M., Sommer A., Hametner C., Foissner I. 2017. Clathrin in *Chara australis*: Molecular analysis and involvement in charasome degradation and constitutive endocytosis. *Front. Plant Sci.* **8**, 20.

https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00020

- Pavlovič A., Slováková L., Pandolfi C., Mancuso S. 2011. On the mechanism underlying photosynthetic limitation upon trigger hair irritation in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis). *J. Exp. Bot.* 62, 1991–2000.
- 11. Vredenberg W., Pavlovič A. 2013. Chlorophyll *a* fluorescence induction (Kautsky curve) in a Venus flytrap (*Dionaea muscipula*) leaf after mechanical trigger hair irritation. *J. Plant Physiol.* **170**, 242–250.
- Williamson R.E., Ashley C.C. 1982. Free Ca²⁺ and cytoplasmic streaming in the alga *Chara. Nature.* 296, 647–651.
- Berestovsky G.N., Kataev A.A. 2005. Voltage-gated calcium and Ca²⁺-activated chloride channels and Ca²⁺ transients: Voltage-clamp studies of perfused and intact cells of *Chara. Eur. Biophys. J.* 34, 973–986.
- Kreimer G., Melkonian M., Latzko E. 1985. An electrogenic uniport mediates light-dependent Ca²⁺ influx into intact spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* 180, 253–258.
- Johnson C.H., Shingles R., Ettinger W.F. 2007. Regulation and role of calcium fluxes in the chloroplast. In: *The structure and function of plastids*. Eds Wise R.R., Hoober J.K. Dordrecht: Springer, p. 403–416.
- Kamiya N. 1986. Cytoplasmic streaming in giant algal cells: A historical survey of experimental approaches. *Bot. Mag. Tokyo.* 99, 441–467.
- Булычев А.А. 2021. Индукционные изменения флуоресценции клеток *Chara*, связанные с обменом метаболитов между хлоропластами и потоком цитоплазмы. *Биол. мембраны* 38, 187–198.
- Bulychev A.A., Cherkashin A.A., Shapiguzov S.Yu., Alova A.V. 2021. Effects of chloroplast-cytoplasm exchange and lateral mass transfer on slow induction of chlorophyll fluorescence in Characeae. *Physiol. Plant.* 173, 1901–1913.
- 19. Bulychev A.A. 2020. Transient depletion of transported metabolites in the streaming cytoplasm of *Chara* upon shading the long-distance transmission pathway. *Biochim. Biophys. Acta.* **1861**,148257.
- 20. Bulychev A.A., Cherkashin A.A., Rubin A.B., Vredenberg W.J., Zykov V.S., Müller S.C. 2001. Comparative study on photosynthetic activity of chloroplasts in acid and alkaline zones of *Chara corallina*. *Bioelectrochemistry*. **53**, 225–232.
- 21. Tsuchiya Y., Yamazaki H., Aoki T. 1991. Steady and transient behaviors of protoplasmic streaming in *Nitella* internodal cell. *Biophys. J.* **59**, 249–251.
- 22. Ogawa T., Suzuki K., Sonoike K. 2021. Respiration interacts with photosynthesis through the acceptor side of

photosystem I, reflected in the dark-to-light induction kinetics of chlorophyll fluorescence in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front. Plant Sci.* **12**, 717968.

https://doi.org/10.3389/fpls.2021.717968

- 23. Shikanai T., Yamamoto H. 2017. Contribution of cyclic and pseudo-cyclic electron transport to the formation of proton motive force in chloroplasts. *Mol. Plant.* **10**, 20–29.
- Scheibe R. 2004. Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol. Plant.* 120, 21–26.
- 25. Taniguchi M., Miyake H. 2012. Redox-shuttling between chloroplast and cytosol: integration of intrachloroplast and extra-chloroplast metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**, 252–260.
- Bisson M.A., Walker N.A. 1980. The *Chara* plasmalemma at high pH. Electrical measurements show rapid specific passive uniport of H⁺ or OH⁻. *J. Membr. Biol.* 56, 1–7.
- 27. Pertl-Obermeyer H., Lackner P., Schulze W.X., Hoepflinger M.C., Hoeftberger M., Foissner I.,

Obermeyer G. 2018. Dissecting the subcellular membrane proteome reveals enrichment of H^+ (co-) transporters and vesicle trafficking proteins in acidic zones of *Chara* internodal cells. *PLoS One.* **13**, 1–28.

- Kreimer G., Melkonian M., Holtum J.A.M., Latzko E. 1988. Stromal free calcium concentration and lightmediated activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Physiol.* 86, 423–428.
- 29. Stael S., Wurzinger B., Mair A., Mehlmer N., Vothknecht U.C., Teige M. 2012. Plant organellar calcium signalling: an emerging field. *J. Exp. Bot.* 63, 1525– 1542.
- Bulychev A.A. Rybina A.A. 2018. Long-range interactions of *Chara* chloroplasts are sensitive to plasmamembrane H⁺ flows and comprise separate photo- and dark-operated pathways. *Protoplasma*. 255, 1621–1634.
- Pearcy R.W., Krall J.P., Sassenrath-Cole G.F. 2006. Photosynthesis in fluctuating light environments. In: *Photosynthesis and the environment*. Ed. Baker N. Dordrecht: Kluwer, p. 321–346.

Changes of Chloroplast Fluorescence in Relation to Excitability and Metabolite Transport by Cytoplasmic Streaming in *Chara* Cells

A. A. Bulychev^{1, *}, A. V. Alova¹

¹Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: bulychev@biophys.msu.ru

The propagation of action potentials and the transfer of metabolites with the streaming cytoplasm represent two main pathways of long-distance signaling in giant cells of characean algae. This work shows that the excitation of plasma membranes and the arrest of cytoplasmic streaming in Chara cells at low light (in the absence of large-scale pH changes on cell surface) is accompanied by the transient increase or a series of oscillations of chlorophyll F fluorescence in chloroplasts located near the zones of external calcification but has no effect on fluorescence of chloroplasts in the predominant uncalcified cell areas. The different sensitivity to the action potential generation in chloroplasts located near and far from the incrustation zones is probably related to structural and biochemical differences of cellular domains and to the influence of cytoplasmic flow on chloroplast environment in the area of fluorescence measurements. The kinetic curves of F changes upon cell excitation and the number of individual peaks in the F response depended on the illuminated area of plant sample. The number of peaks reduced when overall illumination was replaced with illumination of a narrow cell region using flexible light guides with diameters of 2.0 and 0.4 mm. The results indicate that the initial stages of F changes after the action potential generation are caused by internal processes in chloroplasts, while the subsequent changes in F are due to the influx of metabolites from the recovering cytoplasmic flow into the chloroplasts of the studied zone. The amplitude of excitation-induced F changes decreased transiently after the transition from general to local illumination, which is explained by the consumption of reducing equivalents in the cytoplasm during postillumination CO₂ fixation under cessation of NADPH photoproduction outside the narrow illuminated zone.

Keywords: Characeae, excitable membranes, chlorophyll fluorescence, action potential, cytoplasmic flow, chloroplast membrane transporters, long-distance transport

УДК 577.352.465

ИНГИБИТОР РІЗК И mTOR ВОКСТАЛИСИБ НАРУШАЕТ СОПРЯЖЕНИЕ МУСКАРИНОВОГО РЕЦЕПТОРА МЗ С МОБИЛИЗАЦИЕЙ Са²⁺

© 2022 г. О. О. Лямин^а, П. Д. Котова^{а, *}, Е. А. Дымова^а, П. Ю. Фадеев^а,

О. А. Рогачевская^{*a*}, Е. А. Воронова^{*a*}, С. С. Колесников^{*a*}

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия *e-mail: p.d.kotova@gmail.com Поступила в редакцию 12.12.2021 г. После доработки 24.01.2022 г. Принята к публикации 25.01.2022 г.

Ингибитор PI3K и mTOR киназ воксталисиб считается перспективным лекарственным средством для терапии различных опухолей. Между тем, использование этого соединения в терапевтических целях ассоциируется с рядом побочных эффектов, причины которых не вполне ясны. В данной работе было показано, что в присутствии воксталисиба нарушается внутриклеточная Ca²⁺-сигнализация, инициируемая ацетилхолином в клетках НЕК 293. Данные ингибиторного анализа свидетельствовали о том, что за чувствительность этих клеток к ацетилхолину ответственны преимущественно М3-мускариновые рецепторы и что воксталисиб подавляет Ča²⁺-ответы на ацетилхолин по механизму, не связанному с ингибированием PI3K и/или mTOR. Результаты физиологических экспериментов свидетельствовали о возможности непосредственного влияния воксталисиба на взаимодействие М3-рецепторов с агонистами. С помощью методов вычислительной биофизики, включая докинг и молекулярную динамику, моделировали взаимодействие М3-рецептора с воксталисибом и другими соединениями, которые были использованы в физиологических экспериментах. Вычислительные эксперименты показали, что воксталисиб способен связываться с ортостерическим сайтом М3-рецептора и тем самым препятствовать его активации агонистом. Представляется, что побочные эффекты, возникающие у пациентов при применении воксталисиба, могут быть частично обусловлены ингибированием холинергической сигнальной системы клеток, экспрессирующих М3-рецептор.

Ключевые слова: М3-рецептор, воксталисиб, внутриклеточная Ca²⁺-сигнализация, молекулярная динамика

DOI: 10.31857/S0233475522030070

введение

Фосфорилирование и дефосфорилирование белков, катализируемые разнообразными киназами и фосфатазами, вовлечены в регуляцию большинства клеточных функций и внутриклеточных процессов, включая сигнальные. Сигнальные каскады, протекающие с участием фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), Akt-киназы и мишени рапамицина млекопитающих (mTOR), регулируют множество ключевых процессов, в том числе рост, пролиферацию и метаболизм клеток. Кроме того, показано, что PI3K/Akt/mTORпуть патологически активирован в клетках опухолей различного происхождения, а ингибирование этого пути ведет к регрессии опухолей. В настоящее время в качестве лекарственных средств для противоопухолевой терапии используют ингибиторы сигнальных молекул, вовлеченных в PI3K/Akt/mTOR-сигнализацию [1].

К таким соединениям относится воксталисиб (другие названия этого вещества SAR245409, XL765), ингибирующий одновременно PI3K и mTOR. В данный момент воксталисиб находится на стадии клинических испытаний терапии опухолей различной природы и применяется как самостоятельно, так и в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами и радиотерапией. Установлено, что воксталисиб, используемый даже в качестве монотерапии, вызывает многочисленные побочные эффекты, такие как тошнота, диарея, гипергликемия, снижение аппетита, повышенная утомляемость, сыпь, сухость кожи, астения, рвота и нарушение баланса ферментов печени [2]. Побочные эффекты воксталисиба могут быть связаны с тем, что помимо установленного ингибирования PI3K и mTOR, это вещество может также воздействовать и на другие клеточные мишени. Так, например, в предыдущих исследованиях нами было показано, что такие ингибиторы PI3K, как LY294002, LY303511 и PI828, подавляют Ca²⁺-сигналы, вызываемые агонистами аминергических рецепторов по механизму, не зависящему от ингибирования PI3K, и, по всей вероятности, воздействуя непосредственно на рецепторы [3, 4]. В данной работе в физиологических экспериментах мы исследовали ингибирующее воздействие воксталисиба на Ca²⁺-сигналы, инициируемые ацетилхолином, а также попытались объяснить природу этого явления, используя методы вычислительной биофизики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микрофотометрия. В работе использовали клетки линии НЕК 293, которые культивировали в среде DMEM (Gibco), содержащей 4.5 г/л глюкозы. 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma), 2 мМ глутамина (Sigma) во влажной атмосфере с 5% СО₂ в воздухе при 37°С. Для эксперимента клетки снимали с культурального пластика 0.25% раствором трипсина (Sigma), а затем прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak (Corning). При всех дальнейших манипуляциях клетки находились во внеклеточном растворе, содержащем (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, рН 7.4, 10 глюкозы (все соли и буфер произведены Sigma). Для загрузки флуоресцентным Ca²⁺-зондом Fluo-4 клетки инкубировали в присутствии проникающего через мембрану Fluo-4 AM (4 мкМ) и детергента Pluronic (0.02%) (оба Molecular Probes) при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем клетки отмывали внеклеточным раствором и выдерживали в нем при комнатной температуре в течение 1 ч.

Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20×/0.75 и цифровой EMCCD камерой LucaR (Andor Technology). Флуоресценцию клеток возбуждали на длине волны 480 ± 10 нм, эмиссию регистрировали в области 520 ± 20 нм, что соответствует спектральным характеристикам Fluo-4. Изменение уровня Ca²⁺ в цитоплазме оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции Fluo-4 $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F и F_0 – интенсивность эмиссии Ca²⁺-индикатора в текущий момент времени и в начале регистрации, соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS Elements (Nikon). Полученные экспериментальные данные обрабатывали с помощью программы Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc).

Все химические соединения, использованные в описанных ниже экспериментах, применяли путем полной замены раствора в фотометрической камере с помощью системы перфузии. В работе использовали: ацетилхолин (Acetylcholine, Tocris), воксталисиб (Voxtalisib, Selleckchem), вортманнин (Wortmannin, Tocris), рапамицин (Rapamycin, InvivoGen) и 4-DAMP (Tocris).

Компьютерное моделирование. При компьютерном моделировании механизмов взаимодействия исследуемых соединений с мускариновым М3-рецептором применяли два метода вычислительной биофизики: докинг — для определения энергетически наиболее выгодных положений исследуемых соединений на рецепторе; молекулярную динамику — для анализа вероятной эволюции во времени предсказанных докингом комплексов.

Для этого использовали 3D-структуру мускаринового М3-рецептора, полученную из базы данных кристаллографических структур RCSB (https://www.rcsb.org) [5], PDB ID: 4U15 [6]. Из исходной структуры предварительно были удалены все небелковые молекулы, в частности антагонист тиотропиум и белковый фрагмент между 5-й и 6-й трансмембранными спиралями, способствующий кристаллизации. Образовавшийся промежуток заполнили аминокислотным линкером GSGSGSGS; выбор последовательности из глицина и серина мотивирован распространенностью этих аминокислот в природных линкерах, электронейтральностью, короткой боковой цепью и практикой использования в молекулярно-линамическом моделировании лиганлрецепторного взаимодействия [7]. Количество GS-повторов выбрано минимальным, обеспечивающим свободную динамику 5-й и 6-й спиралей рецептора. Положение линкера на концах 5-й и 6-й спиралей смоделировано с помощью SWISS-MODEL [8]. Исходная структура была получена для M3-рецептора крысы (Rattus norvegicus), поэтому в SWISS-MODEL было дополнительно проведено гомологическое моделирование по аминокислотной последовательности рецептора человека, более чем на 90% совпадающей с аминокислотной последовательностью рецептора модельного организма. 3D-структуры соединений ацетилхолин, воксталисиб, вортманнин, рапамицин и 4-DAMP были получены из баз данных ZINC [9] и PubChem [10]. Подготовку всех структур к докингу проводили в AutoDockTools-1.5.6. Докинг осуществляли с помошью Autodock Vina 1.1.2 [11], позволяющего уточнять область на рецепторе, в границах которой надлежит искать наиболее выгодные для образования комплекса конформации лиганда. В качестве такой области было выбрано пространство между трансмембранными спиралями рецептора, ограниченное центром рецептора с одной стороны и внеклеточными петлями с другой. Данный выбор мотивирован наличием в базах данных нескольких экспериментально полученных структур, в которых антагонисты мускаринового рецептора образуют комплекс с рецептором именно в этой области. Ввиду отсутствия кристаллографических структур мускаринового М3-рецептора в комплексе с ацетилхолином, положение ацетилхолина, принимаемое за ортостерический сайт рецептора, также моделировали докингом. Константы диссоциации соединений рассчитывали по формуле $K_d = \exp(1000\Delta G/RT)$, где ΔG – значение скорингфункции Autodock Vina 1.1.2, используемое как аппроксимация свободной энергии связи, *R* – газовая постоянная, равная 1.98 кал/(моль K), и T == 298.15; K - значение абсолютной температуры,используемое Autodock Vina.

Для устранения возникающих при докинге стерических конфликтов. уточнения конформации лиганда на рецепторе и проверки устойчивости предсказанных комплексов было проведено моделирование методом молекулярной динамики. Молекулярно-динамические расчеты выполняли на видеокартах на базе графических процессоров Nvidia 2080 и Nvidia 3080 при помощи инструмента pmemd.cuda, входящего в программное обеспечение Amber 20 [12]. Предварительно для аминокислотных остатков рецептора были определены формы протонирования. Аспартат в положении 113 был протонирован всегда, подобно аспартату в положении 83 в родопсине, протонированному в течение всего фотоцикла [13]. Расчет состояний остальных аминокислотных остатков был осуществлен с использованием PROPKA [14] при рН 7.0. Для сохранения электронейтральности N-и C-концы содержали ацетильную и N-метиламидную группы соответственно.

Ориентирование структуры рецептора с целью ее корректного размещения в мембране было проведено с привлечением инструмента ОРМ [15]. Погружение лиганд-рецепторного комплекса в модель мембраны и водного раствора NaCl в концентрации 0.15 моль/л выполнено с помощью инструмента Packmol Memgen 1.1.0 [16, 17]. В качестве образующих мембрану фосфолипидов использовали молекулы фосфатидилхолина (РОРС). Полученные структуры имели размер примерно 100 × 100 Å и содержали порядка 100000 атомов.

Параметризацию модели осуществляли с помощью входящих в Amber Tools 20 инструментов tleap, antechamber и parmchk2. При параметризации использовали следующие силовые поля: ff19SB — для аминокислотных остатков, lipid17 для молекул мембраны, gaff2 — для лигандов. В качестве модели воды использовали четырехточечную модель OPC. Оптимизацию построенных структур проводили методом итеративной минимизации потенциальной энергии с помощью входящего в Amber Tools 20 инструмента pmemd. Количество итераций составляло 5000, из них 2500 проводили методом наискорейшего спуска. Затем система была разогрета до 310 К (37°С) и приведена в равновесное состояние в два этапа: вначале в условиях канонического ансамбля (NVT) на протяжении 1 нс с временным шагом 0.002 пс, а затем для выравнивания плотности дополнительно в условиях изотерм-изобарического ансамбля (NPT) при температуре 310 К и давлении 1 атм на протяжении 1 нс с временным шагом 0.002 пс. Полученные структуры использовали в качестве исходных для молекулярно-динамического моделирования в ансамбле NPT при 310 К и 1 атм. на протяжении не менее 100 нс с временным шагом 0.002 пс. Динамика ковалентных связей с участием атомов водорода ограничивалась в рамках алгоритма SHAKE. Радиус отсечения нековалентных взаимодействий был взят равным 9 Å. Использовали ланжевеновский термостат и баростаты Берендсена (получение равновесного состояния) и Монте-Карло (собственно моделирование). Дальнодействующие электростатические взаимодействия рассчитывали методом Эвальда (Particle Mesh Ewald method).

Моделирование методом ускоренной молекулярной динамики (accelerated molecular dynamics, или aMD) выполняли при тех же условиях в соответствии с алгоритмом, описанным в руководстве к Amber. Данный алгоритм ускоряет кинетику конформационных блужданий за счет сглаживания пиков и впадин функции потенциальной энергии системы, что позволяет перебирать значительно большее количество состояний системы, чем в стандартной молекулярной динамике при том же времени вычислений. Параметры пороговых значений энергии и факторы ускорения *ethreshp, ethreshd, alphap, alphad* рассчитывали по формулам, предложенным в руководстве к Amber.

Изображения формировали с помощью программного обеспечения PyMOL [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физиологические эксперименты показали, что 50–80% клеток НЕК 293 отвечают на стимуляцию ацетилхолином в концентрации 1 мкМ мобилизацией внутриклеточного Ca²⁺, при этом ответы практически всех холинергических клеток полностью подавляются в присутствии 30 мкМ воксталисиба (рис. 1*a*). Специфичность действия воксталисиба по отношению к холинергической сигнальной системе подтверждается отсутствием ингибирующего действия этого соединения на Ca²⁺-сигнализацию, инициируемую пуринергическим агонистом ATP (рис. 1*a*). Поскольку воксталисиб является ингибитором PI3K и mTOR, подавление Ca²⁺-ответов на ацетилхолин формально можно интерпретировать как свидетельство участия PI3K/Akt/mTOR пути в их генерации. Для проверки участия PI3K и mTOR в генерации Ca²⁺-ответов на ацетилхолин мы использовали ингибиторы этих молекул другой химической природы. Оказалось, что классический ингибитор PI3К вортманнин не влиял на способность клеток отвечать на ацетилхолин даже в случае предварительной инкубации с ним (рис. 1δ). Стоит отметить, что вортманнин ингибирует PI3K необратимо [19], и подавление Са²⁺-ответов в присутствии воксталисиба, апплицированного после вортманнина (рис. 16), может быть объяснено только воздействием воксталисиба на мишень, отличную от PI3K. Таким образом, эксперименты с вортманнином показали, что PI3K не играет заметной роли в генерации клеточных ответов на ацетилхолин, но оставляли возможность того, что ингибирующее действие воксталисиба может быть связано с воздействием на другую его мишень – mTOR. Такая возможность была проверена с помощью классического ингибитора mTOR рапамицин, который, как оказалось, также не блокировал ответы на ацетилхолин при различных протоколах его использования (рис. 1в). Поскольку раздельное применение ингибиторов PI3K и mTOR не приводило к подавлению ответов, аналогичному эффекту воксталисиба, они были применены совместно. Оказалось, что и в этом случае клетки генерировали полноценные ответы на ацетилхолин (рис. 1г). Таким образом, результаты экспериментов с классическими ингибиторами PI3K и mTOR однозначно свидетельствовали о том, что PI3K/Akt/mTOR путь не играет принципиальной роли в генерации Ca²⁺-сигналов, вызываемых ацетилхолином в клетках НЕК 293. Следовательно, воксталисиб блокирует Ca²⁺-ответы на ацетилхолин не за счет ингибирования PI3К и/или mTOR, а воздействует на другие клеточные мишени.

При анализе других возможностей обращал на себя внимание тот факт, что воксталисиб блокировал ответы на ацетилхолин при одновременной аппликации с ним (рис. 1*a*), тогда как обычно ингибирование внутриклеточных мишеней в интактных клетках происходит с некоторой задержкой. Последняя определяется временем, требуемым для проникновения ингибитора через плазматическую мембрану и его накопления в цитозоле до необходимого уровня. Тот факт, что воксталисиб блокировал клеточные ответы без предварительной инкубации, указывал на возможность внеклеточного действия этого соединения, т.е. в качестве вероятной мишени могли выступать сами мускариновые рецепторы.

Известно, что клетки линии НЕК 293 эндогенно экспрессируют мускариновые рецепторы, из которых М3-изоформа является доминантной [20]. Наши эксперименты также показали, что за чувствительность НЕК 293 к ацетилхолину ответственны преимущественно М3-рецепторы. Так, антагонист М3-рецептора 4-DAMP оказался весьма эффективным и блокировал Ca²⁺-ответы всех холинергических клеток уже при концентрации 5-10 нМ при одновременной аппликации с ацетилхолином (1 мкМ) (рис. 2). Таким образом, физиологические эксперименты косвенно подтверждают идею о том, что М3-рецепторы могли быть мишенью действия воксталисиба. Для независимого подкрепления такой возможности было проведено компьютерное моделирование взаимодействия М3-рецептора с веществами, которые были использованы в экспериментах.

Моделирование методом докинга показало, что молекулы рапамицина и вортманнина могут занимать зоны в области внеклеточных петель рецептора, так называемом вестибюле, а молекулы воксталисиба и 4-DAMP могут локализоваться глубоко в трансмембранной полости рецептора, располагаясь в непосредственной близости от ортостерического сайта (рис. 3). Количественной характеристикой локализации соединений на рецепторе могут служить расстояния между геометрическими центрами соединений и геометрическим центром ацетилхолина, рассчитанные усреднением предсказанных докингом координат тяжелых атомов. Оценки этих расстояний для воксталисиба, 4-DAMP, рапамицина и вортманнина дают значения 2.49, 3.04, 14.44 и 11.66 Å соответственно.

Для оценки аффинности соединений воксталисиб и 4-DAMP к рецептору в положении ортостерического сайта мы использовали значения скоринг-функции, полученные Autodock Vina при докинге, которые для воксталисиба и 4-DAMP оказались равны -8.9 и -10.1 соответственно.

Рис. 1. Влияние ингибиторов PI3K и mTOR на Ca²⁺-ответы клеток HEK 293 на ацетилхолин. На рисунках представлены репрезентативные регистрации Ca²⁺-ответов одиночных клеток; моменты и продолжительность аппликаций веществ обозначены горизонтальными линиями выше экспериментальной кривой. Изменение внутриклеточного Ca²⁺ оценивали по относительному изменению флуоресценции Fluo-4 согласно формуле: $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F и F_0 – текущая интенсивность эмиссии зонда и его эмиссия в начале регистрации соответственно.

a – Ответы клетки на ацетилхолин (ACh) (1 мкМ) и ATP (1 мкМ) в контроле и в присутствии ингибитора PI3K и mTOR воксталисиба (30 мкМ) (n = 72); δ – ответы клетки на ацетилхолин (1 мкМ) в контроле и в присутствии ингибитора PI3K вортманнина (10 мкМ) и воксталисиба (30 мкМ) (n = 46); e – ответы клетки на ацетилхолин (1 мкМ) в контроле и в присутствии ингибитора mTOR рапамицина (5 мкМ) и воксталисиба (30 мкМ) (n = 32); e – ответы клетки на ацетилхолин в контроле в присутствии воксталисиба (30 мкМ) и смеси вортманнина (10 мкМ) и рапамицина (5 мкМ) и смеси вортманнина (10 мкМ) и рапамицина (5 мкМ) (n = 19).





Рис. 2. Подавление Ca^{2+} -ответов клеток НЕК 293 на ацетилхолин антагонистом M3-рецепторов 4-DAMP. Репрезентативная регистрация Ca^{2+} -ответов клеток на ацетилхолин (1 мкМ) в контроле и в присутствии 4-DAMP (2 нМ) (n = 50).



Рис. 3. Комплексы М3-рецептора с исследовавшимися соединениями. Представлены предсказанные докингом конформации, энергетически наиболее выгодные для образования комплексов. Воксталисиб изображен желтым цветом, 4-DAMP – бирюзовым, рапамицин – фиолетовым, вортманнин – оранжевым, ацетилхолин – зеленым. TM1, TM3, TM5 и TM6 – трансмембранные 1, 3, 5 и 6-я спирали рецептора соответственно.

a — Общий вид рецептора, фиолетовым выделена область внеклеточных петель с расположенными в ней молекулами рапамицина и вортманнина, зеленым — область ортостерического сайта, содержащая молекулы воксталисиба и 4-DAMP; б — увеличенный вид ортостерического сайта и внеклеточных петель, связанных с молекулами указанных соединений; *в* — ортостерический сайт рецептора, связанный с 4-DAMP и воксталисибом.

С точностью до ранее установленной погрешности 2.85 ккал/моль [11] эти величины могут быть использованы как оценки свободной энергии связи для воксталисиба и 4-DAMP и тем самым позволяют оценить константы диссоциации K_d (см. Материалы и методы). Следует отметить, что хотя оцениваемая таким образом величина K_d может существенно отклоняться от истинного значения константы диссоциации, относительные расчетные величины могут давать вполне реалистичные оценки. Так, например, для мускариновых рецепторов ранее было показано, что отношение констант диссоциации ингибитора PI3-киназы LY294002 и его аналога LY303511, полученных из расчетов, согласуется с результатами эксперимента [3]. Отношение расчетных констант диссоциации для воксталисиба и 4-DAMP составляет 7.63. Такое значение в целом отражает результаты экспериментов, в соответствии с которыми 4-DAMP подавлял Ca²⁺-ответы на ацетилхолин в дозах, значительно меньших, чем те, которые требовались в случае воксталисиба.

Построенные молекулярно-динамические траектории длительностью 100 нс продемонстрировали, что предсказанные докингом комплексы в целом устойчивы и что локализация лигандов в



Рис. 4. Эволюция комплексов мускаринового М3-рецептора с исследуемыми соединениями. Представлены последовательности кадров молекулярно-динамических траекторий комплексов, полученных через 25, 50, 75 и 100 нс после начала симуляции. Начальная конфигурация определялась докингом. Видно, что молекулы воксталисиба и 4-DAMP сохраняют положение в области ортостерического сайта рецептора, вортманнина и рапамицина – в области внеклеточных петель. Соединения изображены с атомами водорода.

структуре рецептора существенно не меняется за указанное время. Так, молекулы воксталисиба и 4-DAMP оставались в области ортостерического сайта рецептора, а рапамицин и вортманнин в вестибюле (рис. 4). На примере тиотропиума молекулярно-динамическое моделирование ранее выявило, что антагонисты мускариновых рецепторов не сразу следуют в ортостерический сайт, а способны задерживаться в вестибюле [21]. Чтобы проверить возможность перемещения рапамицина и вортманнина из вестибюля в ортостерический сайт рецептора на временны́х интервалах длиннее 100 нс, конформационные блуждания соответствующих комплексов анализировали методом ускоренной молекулярной динамики. Нами было получено несколько ускоренных тра-



Рис. 5. Локализация молекул вортманнина и рапамицина в вестибюле M3-рецептора (вид из внеклеточного пространства). *а* – Локализация молекулы вортманнина (оранжевый), предсказанная докингом. При этой конфигурации вортманнин, вероятно, препятствует прохождению ацетилхолина (зеленый) в область ортостерического сайта; *б* – положение молекулы вортманнина, полученное при симуляции методом ускоренной молекулярной динамики; *в* – положение молекулы рапамицина (фиолетовый) в области ортостерического сайта, предсказанное докингом. Видно, что рапамицин стерически блокирует вестибюль и препятствует прохождению ацетилхолина (зеленый) в область ортостерического сайта.



Рис. 6. Диссоциация рапамицина из области вестибюля M3-рецептора в раствор. Последовательность кадров молекулярно-динамической траектории комплекса мускаринового M3-рецептора с рапамицином; моделирование методом ускоренной молекулярной динамики.

a - Йсходное положение, в котором рапамицин расположен в вестибюле рецептора; $\delta -$ промежуточная конфигурация, при которой рапамицин еще взаимодействует со 2-й внеклеточной петлей рецептора, но вестибюль уже практически свободен; b - полная диссоциация рапамицина в раствор.

екторий для комплексов рецептора с рапамицином и вортманнином на длительностях в несколько сотен наносекунд. Данное моделирование показало, что вортманнин остается в вестибюле, не перемещаясь в область ортостерического сайта, но и не диссоциируя в раствор. При этом рецептор мог принимать конформации, при которых в вестибюле, занятом молекулой вортманнина, сохраняется свободное пространство. По-видимому, размеры этого пространства достаточны для проникновения ацетилхолина в область ортостерического сайта рецептора (рис. 5a, 5δ), как это предполагают физиологические эксперименты (рис. 1δ). Для окончательного вывода требуется построение траекторий в микросекундном диапазоне.

В исходном положении, предсказанном докингом, рапамицин занимает все пространство вестибюля и не оставляет возможности для прохода ацетилхолина (рис. 5 $_{\theta}$). Между тем, как показало моделирование с применением ускоренной молекулярной динамики, при достаточно продолжительной эволюции молекулярная система может принимать такие конформации, при которых рапамицин диссоциирует в раствор, освобождая вестибюль агонисту для его свободного перемещения в область ортостерического сайта (рис. 6).

В целом, компьютерное моделирование показало, что воксталисиб и 4-DAMP способны конкурировать с агонистом за ортостерический сайт рецептора и тем самым препятствовать его активации. В присутствии рапамицина и вортманнина ортостерический сайт, напротив, доступен для ацетилхолина, что позволяет активировать рецептор. При этом доступность ортостерического сайта для агониста в присутствии рапамицина и вортманнина обеспечивается по различным сценариям. Представляется, что в вестибюле связанный вортманнин оставляет, по крайней мере при некоторых достижимых рецептором конформациях, достаточно пространства для прохода ацетилхолина в ортостерический сайт рецептора. Хотя вестибюль блокируется при связывании рапамицина, этот ингибитор не способен надолго задерживаться в этой области и диссоциирует в раствор, оставляя рецептор для свободного взаимодействия с ацетилхолином. Предложенные по результатам моделирования механизмы вполне объясняют, почему воксталисиб и 4-DAMP способны ингибировать Ca²⁺-ответы клеток на ацетилхолин, в то время как рапамицин и вортманнин были неэффективны (рис. 1, 2).

Таким образом, полученные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что воксталисиб способен взаимодействовать с мускариновыми рецепторами М3-типа и блокировать внутриклеточную Ca²⁺-сигнализацию, индуцированную ацетилхолином. Эти данные указывают на то, что побочные эффекты, возникающие у пациентов при приеме воксталисиба, могут быть связаны не только с его воздействием на сигнальный каскад PI3K/Akt/mTOR, но и с угнетающим влиянием воксталисиба на холинергическую систему, играющую ключевую роль во многих физиологических процессах [22, 23].

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 20-74-00056. Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Porta C., Paglino C., Mosca A. 2014. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front Oncol.* **4**, 64.
- Mishra R., Patel H., Alanazi S., Kilroy M.K., Garrett J.T. 2021. PI3K inhibitors in cancer: Clinical implications and adverse effects. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3464.
- Kotova P.D., Kochkina E.N., Lyamin O.O., Rogachevskaja O.A., Kovalenko N.P., Ivashin D.S., Bystrova M.F., Enukashvily N.I., Kolesnikov S.S. 2020. Calcium signaling mediated by aminergic GPCRs is impaired by the PI3K inhibitor LY294002 and its analog LY303511 in a PI3K-independent manner. *Eur. J. Pharmacol.* 880, 173182.
- Дымова Е.А., Рогачевская О.А., Воронова Е.А., Котова П.Д. 2021. PI828 подавляет Ca²⁺-сигнализацию, инициируемую аминергическими агонистами, по механизму, независимому от ингибирования PI3-киназы. Биол. мембраны. 38 (5), 265–273.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242.
- Thorsen T.S., Matt R., Weis W.I., Kobilka B.K. 2014. Modified T4 lysozyme fusion proteins facilitate G protein-coupled receptor crystallogenesis. *Structure*. 22 (11), 1657–1664.
- Reddy Chichili V.P., Kumar V., Sivaraman J. 2013. Linkers in the structural biology of protein-protein interactions. *Protein Sci.* 22 (2), 153–167.
- Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. 2018. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, W296–W303.
- Sterling T., Irwin J.J. 2015. ZINC 15 Ligand discovery for everyone. J. Chem. Inf. Model. 55 (11), 2324–2337.
- Kim S., Chen J., Cheng T., Gindulyte A., He J., He S., Li Q., Shoemaker B.A., Thiessen P.A., Yu B., Zaslavsky L., Zhang J., Bolton E.E. 2021. PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Res.* 49 (D1), D1388–D1395.
- Trott O., Olson A.J. 2010. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31, 455–461.
- Case D.A., Aktulga H.M., Belfon K., Ben-Shalom I.Y., Brozell S.R., Cerutti D.S., Cheatham T.E. III, Cisneros G.A., Cruzeiro V.W.D., Darden T.A., Duke R.E., Giambasu G., Gilson M.K., Gohlke H., Goetz A.W., Harris R., Izadi S., Izmailov S.A., Jin C., Kasavajhala K., Kaymak M.C., King E., Kovalenko A., Kurtzman T., Lee T.S., LeGrand S., Li P., Lin C., Liu J., Luchko T., Luo R., Machado M., Man V., Manathunga M., Merz K.M., Miao Y., Mikhailovskii O., Monard G.,

Nguyen H., O'Hearn K.A., Onufriev A., Pan F., Pantano S., Qi R., Rahnamoun A., Roe D.R., Roitberg A., Sagui C., Schott-Verdugo S., Shen J., Simmerling C.L., Skrynnikov N.R., Smith J., Swails J., Walker R.C., Wang J., Wei H., Wolf R.M., Wu X., Xue Y., York D.M., Zhao S., Kollman P.A. 2021. Amber 2021. University of California, San Francisco.

- Fahmy K., Jäger F., Beck M., Zvyaga T.A., Sakmar T.P., Siebert F. 1993. Protonation states of membrane-embedded carboxylic acid groups in rhodopsin and metarhodopsin II: A Fourier-transform infrared spectroscopy study of site-directed mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 90, 10206–10210.
- Jurrus E., Engel D., Star K., Monson K., Brandi J., Felberg L.E., Brookes D.H., Wilson L., Chen J., Liles K., Chun M., Li P., Gohara D.W., Dolinsky T., Konecny R., Koes D.R., Nielsen J.E., Head-Gordon T., Geng W., Krasny R., Wei G.W., Holst M.J., McCammon J.A., Baker N.A. 2018. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci.* 27 (1), 112– 128.
- Lomize M.A., Pogozheva I.D, Joo H., Mosberg H.I., Lomize A.L. 2012. OPM database and PPM web server: Resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.* 40, D370–376.
- Martinez L., Andrade R., Birgin E.G., Martinez J.M. 2009. Packmol: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* **30** (13), 2157–2164.
- 17. Nugent T., Jones D.T. 2013. Membrane protein orientation and refinement using a knowledge-based statistical potential. *BMC Bioinformatics*. 14, 276.

- 18. Schrodinger, LLC. 2015. The PyMOL molecular graphics system. Version 2.2.
- Powis G., Bonjouklian R., Berggren M.M., Gallegos A., Abraham R., Ashendel C., Zalkow L., Matter W.F., Dodge J., Grindey G. 1994. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res.* 54 (9), 2419–2423.
- Atwood B.K., Lopez J., JWager-Miller J., Mackie K., Straiker A. 2011. Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC Genomics.* 12, 14.
- Kruse A.C., Hu J., Pan A.C., Arlow D.H., Rosenbaum D.M., Rosemond E., Green H.F., Liu T., Chae P.S., Dror R.O., Shaw D.E., Weis W.I., Wess J., Kobilka B.K. 2012. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*. 482 (7386), 552–556.
- Abrams P., Andersson K.E., Buccafusco J.J., Chapple C., de Groat W.C., Fryer A.D., Kay G., Laties A., Nathanson N.M., Pasricha P.J., Wein A.J. 2006. Muscarinic receptors: Their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br. J. Pharm.* 148, 565–578.
- 23. Saternos H.C., Almarghalani D.A., Gibson H.M., Meqdad M.A., Antypas R.B., Lingireddy A., AbouAlaiwi W.A. 2018. Distribution and function of the muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system. *Physiol. Genomics.* **50**, 1–9.

PI3K and mTOR Inhibitor Voxtalisib Antagonizes Coupling of M3 Muscarinic Receptor to Ca²⁺ Mobilization

O. O. Lyamin¹, P. D. Kotova¹, *, E. A. Dymova¹, P. Yu. Fadeev¹, O. A. Rogachevskaja¹, E. A. Voronova¹, S. S. Kolesnikov¹

¹Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

*e-mail: p.d.kotova@gmail.com

The compound Voxtalisib, a PI3K and mTOR inhibitor, is believed to be a promising drug for the cancer therapy. However, the therapeutic use of Voxtalisib has shown that this drug can elicit a number of side effects with unclear mechanisms. As was demonstrated here, Voxtalisib was capable of destroying intracellular Ca²⁺ signaling triggered by acetylcholine (ACh) in HEK 293 cells. The inhibitory analysis suggested that just the muscarinic receptor M3 was largely involved in mediating ACh-induced Ca²⁺ signals in HEK 293. The obtained evidence indicated that Voxtalisib suppressed cellular responses to ACh by a mechanism that was unrelated to the inhibition of PI3K and/or mTOR. The physiological data suggested that Voxtalisib could directly influence the interaction of ACh with the M3 receptor. By employing computational biophysics approaches, including molecular docking and molecular dynamics, we simulated interactions of the M3 receptor with Voxtalisib and other compounds used at physiological experimentation. Computational experiments have demonstrated that Voxtalisib is indeed able to bind to the orthosteric site of the M3 receptor, thereby preventing its activation by ACh. Thus, it appears that some of the side effects reported in patients receiving Voxtalisib may be due to the inhibition of cholinergic signaling that this drug can cause in cells expressing the M3 receptor.

Keywords: M3 receptor, Voxtalisib, intracellular Ca²⁺ signaling, molecular dynamics

УДК 576.311.348.7;576.311.346.2

N-КОНЦЕВОЙ ФРАГМЕНТ ВИМЕНТИНА ОТВЕЧАЕТ ЗА СВЯЗЬ С МИТОХОНДРИЯМИ *IN VITRO*

© 2022 г. А. А. Даял^{*a*}, Н. В. Медведева^{*a*}, А. А. Минин^{*a*}, *

^аИнститут белка РАН, Москва, 119334 Россия *e-mail: alexminin@gmail.com Поступила в редакцию 17.01.2022 г. После доработки 29.01.2022 г. Принята к публикации 31.01.2022 г.

Роль промежуточных филаментов в регуляции функций митохондрий стала очевидной в результате исследований последних лет. Так, ранее было показано, что виментин влияет на подвижность митохондрий и на уровень их мембранного потенциала. Однако было неизвестно, может ли он связываться с митохондриями напрямую, без участия белков-посредников. В настоящей работе при помощи биоинформатического анализа была исследована последовательность виментина и обнаружен участок в N-концевой части молекулы, который может играть роль сигнала митохондриальной локализации, т.е. непосредственно связываться с этими органеллами. Чтобы экспериментально проверить такую возможность, при помощи центрифугирования через сахарозную "подушку" исследовалось связывание митохондрий, изолированных из печени крысы, с протофиламентами, полученными из рекомбинантного виментина человека. Показано, что виментин может связываться с митохондриями *in vitro*. Обнаружено, что под действием связанной с митохондриями протеазы происходит потеря N-концевой части молекулы виментина и нарушается ее взаимодействие с митохондриями. При помощи ингибиторного анализа было выяснено, что ответственным за деградацию виментина является атипичный кальпаин, цистеиновая Ca^{2+} -зависимая протеаза, не чувствительная к действию кальпастатина.

Ключевые слова: митохондрии, виментин, промежуточные филаменты **DOI:** 10.31857/S0233475522030057

введение

Промежуточные филаменты (ПФ), один из основных компонентов цитоскелета животных клеток, выполняют разнообразные функции [1, 2]. Виментиновые ПФ (ВПФ), будучи типичными для мезенхимных клеток, придают им механическую прочность [3], регулируют внутриклеточный транспорт [4], участвуют в передаче различных сигналов [5] и обеспечивают нормальное функционирование митохондрий [6]. Так, было показано, что нарушения функций митохондрий часто связаны с болезнями, которые вызваны мутациями в генах различных белков ПФ. Например, отмечались патологические изменения в морфологии, распределении и дыхательных функциях митохондрий у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, вызванными мутациями в белках нейрофиламентов [7], и у больных с миопатиями и кардиомиопатиями, у которых наблюдались мутации в гене десмина [8]. Нарушения в функциях митохондрий наблюдаются также у больных булезным эпидермолизом, вызванным мутациями в генах кератинов [9], и в фибробластах, полученных из мышей с нокаутом гена виментина [10]. Поскольку митохондрии играют центральную роль в клеточной физиологии, являясь основным источником энергии [11] и регулятором внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [12], а также участвуют в индукции апоптоза [13], представляется важным выяснить, как взаимодействие с виментином влияет на их свойства.

Одним из первых вопросов, вставших перед исследователями, был следующий: способен ли виментин напрямую связываться с митохондриями, или для этого необходимы белки-посредники. Данные, полученные в лаборатории Г. Вихе, указывали на вероятную роль в этом процессе плектина — белка, способного связывать как промежуточные филаменты, так и другие цитоскелетные структуры и органеллы [14, 15]. Обнару-

Список сокращений: $\Pi \Phi$ — промежуточные филаменты, ВПФ — виментиновые промежуточные филаменты, ВСА бицинхониновая кислота, ТОМ — транслоказа наружной мембраны митохондрий, ТІМ — транслоказа внутренней мембраны митохондрий, ПААГ — полиакриламидный гель, PMSF — фенилметилсульфонилфторид, SDS — додецилсульфат натрия.

женная изоформа плектина lb, которая специфически связывается с митохондриями и колокализуется с ВПФ, могла бы играть такую роль посредника. Однако в мышиных фибробластах с нокаутом гена плектина lb не было выявлено изменений в распределении и функциях митохондрий [15].

Ранее мы продемонстрировали, что в фибробластах, лишенных виментина, митохондрии более подвижны [16] и обладают пониженным мембранным потенциалом [6]. Восстановление ВПФ в таких клетках при помощи трансфекции плазмидой, кодирующей виментин, снижало подвижность и увеличивало уровень потенциала митохондий [6, 16]. Используя серию мутантов виментина, мы определили участок, отвечающий за ингибирование подвижности митохондрий [16]. Он располагается в N-концевой части молекулы виментина между 41-й и 96-й аминокислотными остатками. Отдельно экспрессируемый в клетках такой пептид имеет митохондриальную локализацию [16]. Особенностью этого участка, отвечающего за связь виментина с митохондриями, является его структурное сходство с сигналами митохондриальной локализации, обнаруженными у других митохондриальных белков. Эти сигналы характеризуются наличием слабогидрофобной последовательности, ограниченной с двух сторон группами положительно заряженных аминокислот [17]. Виментин с точечными мутациями в этом участке образовывал филаменты, но терял способность ограничивать подвижность митохондрий [16, 18]. На основании этих результатов мы предположили, что виментин может непосредственно связываться с митохондриями без участия каких-либо посредников.

Целью настоящей работы была экспериментальная проверка этого предположения. Начали мы с поиска сигнала митохондриальной локализации в последовательности виментина при помощи программы TargetP-1.1, чтобы выяснить, может ли выполнять эту роль обнаруженный нами ранее [16] участок в N-концевой части молекулы. Получив утвердительный ответ, мы проверили, может ли очищенный рекомбинантный виментин связываться напрямую с митохондриями, изолированными из печени крысы, in vitro. Для разделения свободного виментина и митохондрий со связанным виментином было использовано центрифугирование через слой сахарозы. Чтобы избежать осаждения виментина в форме длинных филаментов независимо от митохондрий, мы использовали белок с мутацией Vim(Y117L), блокирующей сборку П Φ на стадии протофиламентов [19], которые седиментируют только при высокоскоростном центрифугировании. Наши данные свидетельствуют о том, что

виментин связывается с митохондриями, и за это взаимодействие отвечает N-концевая часть его молекулы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмиды и антитела. Для клонирования и экспрессии мутантных форм виментина использовали вектор pET-23b+. Чтобы получить плазмиду pET-23b(+)-Vim, кДНК, кодирующую человеческий виментин (из плазмиды pIRES-GFP-Vim), амплифицировали при помощи ПЦР с праймерами ТТТСАТАТСТССАССАСС-ТСССТ и ТТТААGCTTCTCGAGGTCATCGTG и вставляли в вектор по сайтам Nde I и Hind III. Плазмиду pET-23b(+)-Vim(Y117L), кодирующую виментин с заменой тирозина Ү117 на лейцин, получили при помощи инвертированного ПЦР [20] плазмиды pET-23b(+)-Vim с праймерами TTAATCG-ACAAGGTGCGCTTCCT и GTTGGCGAAGCG-**GTCATTCAGC** с последующим лигированием продукта по тупым концам. Для получения плазмиды pET-23b(+)-Vim(Y117L)-delta-C, кодируюшей делеционный мутант виментина, лишенный 55 аминокислот с С-конца, использовали ПЦР плазмиды pET-23b(+)-Vim (Y117L) с праймерами TTTCATATGTCCACCAGG-TCCGT и ТТТА-АGCTTTTAAATCCTGCTCTCCTCG и вставляли в вектор pET-23b+ по сайтам Nde I и Hind III. Правильность продуктов клонирования проверяли секвенированием.

Для иммуноблотинга использовали моноклональные мышиные антитела против виментина V-9 (Sigma, США). В качестве вторичных антител использовали кроличьи анти-мышиные антитела, конъюгированные с пероксидазой из хрена (The Jackson Laboratory, США).

Выделение и очистка виментина. Экспрессию виментина в бактериях проводили методом автоиндукции. Клетки Escherichia coli BL21, трансформированные соответствующей плазмидой, инкубировали в среде LB в течение ночи при 37°С. Затем 25 мл ночной культуры переносили в 500 мл 3-кратной среды LB, содержащей 100 мкг/мл карбенициллина и инкубировали при интенсивном перемешивании при 37°С в течение дня, затем продолжали выращивание в течение ночи при 30°С. Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 4000 g в течение 20 мин, супернатант удаляли, клеточный осадок суспендировали в 50 мл лизис-буфере 5 мМ Трис-HCl pH 8.4, 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA с добавлением смеси ингибиторов протеаз (S8830, Sigma), разделяли на порции по 10 мл, замораживали и хранили при –20°С. Клетки разрушали в течение 4 мин при помощи ультразвукового дезинтегратора Sonic Dismembrator 550 (Fisher Scientific, CША).

Затем тельца включения осаждали центрифугированием в течение 30 мин при 15000 об/мин в роторе JA-20 (Beckman, США). Осадок отмывали несколько раз. последовательно заменяя среду (1 раз лизис-буфер, 1 раз лизис-буфер, содержащий 1% Triton X-100, 1 раз лизис-буфер, содержащий 1 M NaCl, и 1 раз лизис-буфер). Осадок "отмытых" телец включения хранили при -20°С. Для выделения виментина из телец включения их растворяли в 5 мМ буфере Трис-HCl, pH 8,4, содержащем 8 М мочевины и ингибиторы протеаз S8830 (Sigma), и центрифугировали в течение 30 мин при 15000 об/мин на роторе ЈА-20. Ренатурацию белка проводили при помощи диализа против буфера 5 мМ Трис-HCl, pH 8,4, постепенно снижая концентрацию мочевины: 6 М мочевины в течение 30 мин при комнатной температуре, 4 М мочевины (30 мин, при комнатной температуре), 2 М мочевины (30 мин, при 4°С), буфер без мочевины (дважды по 60 мин при 4°С). Полученный раствор белка центрифугировали 30 мин при 30000 об/мин в роторе TLS-55 на центрифуге TL100 (Beckman, Germany). Концентрация виментина в растворе, которую определяли методом ВСА с использованием бицинхониновой кислоты, составляла около 2.0 мг/мл.

Выделение митохондрий. Митохондрии выделяли из печени крысы с соблюдением всех правил обрашения с лабораторными животными. Извлеченную печень быстро погружали в холодный солевой раствор на фосфатном буфере (PBS), измельчали ножницами и тщательно отмывали от крови. Гомогенизацию проводили при помощи гомогенизатора Поттера в буфере выделения: 220 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 1 мМ EDTA, 10 мМ К-НЕРЕЅ рН 7.4. На 1 г ткани печени брали 10 мл буфера. Гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин в роторе ЈА-20. Полученный супернатант фильтровали через несколько слоев марли и центрифугировали в течение 20 мин при 9500 об/мин в роторе ЈА-20. Полученный осадок митохондрий гомогенезировали в буфере выделения, а затем повторно центрифугировали 20 мин при 9500 об/мин в роторе ЈА-20. К полученному осадку добавляли 100 мкл буфера выделения (общий объем около 1 мл), ресуспендировали и наслаивали на ступенчатый градиент, состоящий из 1.2 М сахарозы и 1.6 М сахарозы в 10 мМ K-HEPES буфере, pH 7.4. с 1 мМ EDTA, и центрифугировали при 30000 об/мин 20 мин в роторе TLS-55 на центрифуге TL100 (Beckman, Германия). Суспензию митохондрий бурого цвета, хорошо различимую на границе между ступеньками градиента, аккуратно собирали, разводили буфером выделения и осаждали при 9500 об/мин 10 мин в роторе JA-21. К осадку добавляли 50 мкл буфера выделения и ресуспендировали. Концентрация белка в полученном препарате митохондрий составляла 60 ± 20 мг/мл.

Определение связывания виментина с митохондриями. Взаимодействие митохондрий с рекомбинантным виментином определяли при помощи центрифугирования через сахарозную "подушку". Связавшийся виментин оказывался в осадке митохондрий, в то время как свободный белок оставался в супернатанте. Инкубацию виментина (0.1 мг/мл) с митохондриями (2 мг/мл) проводили в 10 мМ буфере K-HEPES, pH 7,4, содержащем 220 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы и 1 мМ EDTA в объеме 420 мкл при 25°С в течение 20 мин. Ингибиторы протеаз лейпептин, кальпептин и PD150606 добавляли, где указано, до конечной концентрации 1.0, 15.0 и 20.0 мкг/мл, соответственно. После инкубации образцы объемом 400 мкл наслаивали на 500 мкл "подушки", представляющей собой плотный неперемешивающийся слой, содержащий 1.2 М сахарозы, 10 мМ K-HEPES, pH 7.4, и 1 мМ EDTA, и центрифугировали при 30000 об/мин в течение 10 мин. 200 мкл супернатантов (верхняя фаза), содержащих несвязавшийся виментин, смешивали с буфером Лэммли (100 мМ ТрисНСІ, pH 6.8, 20% глицерина, 4% SDS, 0.2% бромфенолового синего, 200 мМ 2-В-меркаптоэтанола) и инкубировали 10 мин при 98°С. После тщательной промывки сахарозной "подушки" ее удаляли, осадок митохондрий ресуспендировали в 100 мкл воды, смешивали с буфером Лэммли и инкубировали 10 мин при 98°С. Полученные образцы разделяли при помощи ПААГ-электрофореза в 15% геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану для последующего анализа при помощи иммуноблотинга с антителами к десмину. Виментин на фильтрах выявляли при помощи антител V-9 (Sigma) и вторичных антител в разведении 1:1000 и 1:2000 соответственно и окрашивали с использованием лиаминобензилина.

Биоинформатический анализ последовательностей белков. Для поиска возможного сигнала митохондриальной локализации использовался метод TargetP 1.1. (http://www.cbs.dtu.dk/services/ TargetP-1.1/index.php), который осуществляет расчеты с помощью двухслойных нейронных сетей, обученных на аннотированных последовательностях базы UniProt с уже экспериментально установленным сигналом локализации [21]. Результатом является показатель прогноза, говорящий о наличии или отсутствии пептида с сигналом локализации в митохондрии – mTP. Показатель mTP выше 0.55 свидетельствует о высокой вероятности наличия сигнала митохондриальной локализации.



Рис. 1. Предполагаемые сигналы митохондриальной локализации в N-концевой части молекулы виментина по результатам биоинформатического анализа. *a* – Весь N-концевой домен с фрагментом 1А-домена альфа-спиральной части, показанным в виде синего прямоугольника, и та же часть молекулы, лишенная 40 (*б*) и 78 (*в*) аминокислот с N-конца. Розовым цветом выделены предполагаемые сигнальные последовательности до сайтов гипотетического отщепления (показаны стрелками). Пунктиром выделен ранее определенный участок [16], ответственный за взаимодействие ВПФ с митохондриями. Значения mTP [21], определенные для каждого варианта, показаны рядом с его изображением.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предсказание сигнала митохондриальной локализации в молекуле виментина. Первичная структура найденного нами ранее участка в N-концевой части молекулы виментина [16], который отвечает за взаимодействие ВПФ с митохондриями, позволила предположить, что она может играть роль сигнала митохондриальной локализации [6]. Для проверки этого предположения мы провели биоинформатический анализ молекулы виментина человека при помощи программы Target P 1.1 [21], которая предсказывает наличие сигналов митохондриальной локализации, а также длину сигнальной последовательности до сайта протеолитического расшепления при созревании белка. Анализ показал, что, действительно, последовательность из первых 38 аминокислот молекулы виментина с определенной вероятностью содержит сигнал для локализации в митохондриях (mTP = 0.749) (рис. 1*a*). Поскольку, по нашим данным, делеция участка с 28-й по 39-ю аминокислоту не нарушала способность ВПФ уменьшать подвижность митохондрий [16], а за их связь в мышиных фибробластах ответственным был участок с 45-й по 70-ю аминокислоту (показан на рисунке пунктиром), мы проверили, содержит ли сигнал митохондриальной локализации делеционный мутант виментина, лишенный первых 40 аминокислот. Оказалось, что наличие такого сигнала длиной 48 аминокислот в укороченном N-концевом фрагменте программа TargetP 1.1 предсказывает с очень высокой вероятностью (mTP = 0.943) (рис. 16). Интересно, что при делеции 38 аминокислот с N-конца такого укороченного фрагмента, т.е. участка, содержащего предсказанный сайт связывания митохондрий [16], белок полностью теряет сигнал митохондриальной локализации (mTP = 0.065) (рис. 1*в*). Таким образом, теоретически виментин может связываться с митохондриями, используя сигнал мито-хондриальной локализации, расположенный в его N-концевом домене.

N-конец виментина отвечает за его связывание с митохондриями. Чтобы экспериментально проверить возможность непосредственного связывания виментина с митохондриями, мы использовали рекомбинантный виментин человека, экспрессированный в бактериях, и митохондрии из печени крысы. Виментин, содержащий замену 117-го тирозина на лейцин (Y117L), в результате ренатурации из 8М мочевины образует частицы, которые седиментируют только при высокоскоростном центрифугировании [19]. Поэтому при центрифугировании смеси такого виментина с митохондриями через слой 1.2 М сахарозы он оказывался в осадке только, если связывался с более тяжелыми митохондриями. На рис. 2 видно, что в осадке митохондрий присутствует виментин. Однако это наблюдалось только в том случае, если в инкубационной смеси присутствовали ингибиторы протеаз. Также видно, что инкубация виментина с митохондриями без добавления ингибиторов приводила к его частичной деградации. Молекула виментина, по данным электрофореза, укорачивалась примерно на 10 кДа (рис. 2а), и он практически весь оставался в супернатанте (рис. 26). Таким образом, полноразмерный виментин связывался с митохондриями и осаждался с ними через слой сахарозы, а его укороченный вариант такой способности был лишен. Кроме того, оказалось, что митохондриальная фракция содержит компонент(ы) с протеолитической активностью, приводящей к уко-

N-КОНЦЕВОЙ ФРАГМЕНТ ВИМЕНТИНА



Рис. 2. Рекомбинантный виментин-(Y117L) связывается с митохондриями из печени крысы. *a* – Разделение при помощи электрофореза в ПААГ супернатантов и осадков после центрифугирования смеси виментина и митохондрий в присутствии и в отсутствие ингибиторов протеаз (S8830, Sigma, USA). *б* – Анализ тех же образцов при помощи иммуноблотинга с антителами к виментину.



Рис. 3. Анализ осаждения виментина-(Y117L) с митохондриями. *a* – Разделение при помощи электрофореза в ПААГ супернатантов после центрифугирования смеси виментина и митохондрий в отсутствие и в присутствии различных ингибиторов протеаз. *б* – Анализ осадков после центрифугирования смеси виментина и митохондрий в отсутствие и в присутствие и в присутствии различных ингибиторов протеаз. *б* – Анализ осадков после центрифугирования смеси виментина и митохондрий в отсутствие и в присутствие и в присутствии различных ингибиторов протеаз при помощи иммуноблотинга с антителами к виментину.

рочению молекулы виментина и потере им способности связываться с ними.

Известно, что с митохондриями связано более 40 различных протеаз, которые поддерживают их нормальное функционирование [22]. Мы предположили, что деградация виментина в результате взаимодействия с митохондриями может быть связана с активностью одной (или несколькими) из этих протеаз, и решили выяснить, с какой (какими) именно. Для этого мы использовали ингибиторный анализ. Из смеси ингибиторов протеаз, состоящей из ТАМЕ, пепстатина А, бензамидина, апротинина, PMSF и лейпептина, только последний препятствовал протеолизу виментина (рис. 3*a*). На рис. Зб видно, что в присутствии лейпептина наблюдалось связывание виментина с митохондриями так же, как при добавлении полной смеси ингибиторов протеаз. Поскольку лей-



Рис. 4. Анализ осаждения виментина-(Y117L) с митохондриями после инкубации в отсутствие и в присутствии лейпептина, кальпептина или PD150606. a – Разделение при помощи электрофореза в ПААГ супернатантов после центрифугирования смеси виментина-(Y117L) и митохондрий. δ – Анализ осадков после центрифугирования смеси виментина-(Y117L) и митохондрий в отсутствие и в присутствии ингибиторов протеаз при помощи иммуноблотинга с антителами к виментину.

пептин является ингибитором как цистеиновых, так и сериновых протеаз, а ингибиторы последних, как например PMSF, не препятствовали деградации виментина, мы заключили, что иско-



Рис. 5. Лишенный С-концевого домена виментин-(Y117L) связывается с митохондриями из печени крысы. a — Разделение при помощи электрофореза в ПААГ супернатантов после центрифугирования смеси Δ С-виментина-(Y117L) и митохондрий в присутствии и в отсутствие ингибиторов протеаз. δ — Анализ осадков после центрифугирования смеси Δ С-виментина-(Y117L) и митохондрий в отсутствие и в присутствии ингиппбиторов протеаз при помощи иммуноблотинга с антителами к виментину.

мый фермент относится к цистеиновым протеазам.

Для определения цистеиновой протеазы в митохондриях, ответственной за деградацию виментина, мы использовали более специфические ингибиторы — кальпептин и PD150606. Оказалось, что, в то время как кальпептин, ингибитор кальпаинов и катепсинов L и K [23, 24], эффективно защищал этот виментин от действия протеаз в препарате митохондрий (рис. 4), PD150606, специфический ингибитор кальпаинов I и II [25], не оказывал защитного эффекта (рис. 4). Поскольку PD150606, который ингибирует типичные кальпаины, не защищает виментин от деградации, можно предположить, что искомой протеазой является атипичный кальпаин-10, ранее обнаруженный в митохондриях [26].

Наиболее чувствительными к действию цистеиновых протеаз в молекуле виментина являются N- и C-концевые фрагменты, а центральный альфа-спиральный домен относительно устойчив [27]. Как видно из данных рис. 2 и 3, основной продукт деградации десмина в результате инкубации с митохондриями без ингибиторов протеаз был легче исходного полипептида примерно на 10 кДа. Следовательно, укороченный вариант виментина мог быть лишен как N-, так и C-конца. Поскольку, согласно результатам биоинформатического анализа, за связь с митохондриями отвечает N-конец виментина, мы решили проверить в эксперименте *in vitro* возможное участие C-концевой части молекулы. Для этого мы сконструировали, экспрессировали в бактериях и очистили белок Δ С-виментин-(Y117L), лишенный участка с 412-й по 466-ю аминокислоту. На рис. 5 видно, что в присутствии лейпептина виментин, лишенный С-концевого домена, осаждается с митохондриями точно так же, как целый белок, а в отсутствие ингибитора протеаз он деградирует, и его укороченный вариант остается в супернатанте. Следовательно, виментин может непосредственно связываться с митохондриями, и за это связывание отвечает участок, расположенный в N-концевой части его молекулы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что белок ПФ виментин способен связываться с митохондриями напрямую, без участия каких-либо посредников. Это подтвердило наши предположения, сделанные ранее при изучении свойств митохондрий в фибробластах [6, 16]. Поскольку похожие последовательности аминокислот присутствуют в молекулах некоторых других белков $\Pi \Phi$ [6], можно ожидать, что они также взаимодействуют с митохондриями непосредственно. Так, способность десмина, белка ПФ мышечных клеток, напрямую связываться с митохондриями *in vitro* была нами недавно экспериментально продемонстрирована [28]. Таким образом, по крайней мере, некоторые $\Pi \Phi$, имеющие в своем составе сигнал митохондриальной локализации, могут определять их положение и подвижность в клетках в результате прямого взаимодействия. Эти сигналы узнаются специальными транслоказными комплексами в наружной мембране митохондрий (ТОМ), которые совместно с транслоказными комплексами во внутренней мембране (TIM) отвечают за импорт и локализацию белков в различных митохондриальных компартментах [29]. Однако виментин, как и другие белки ПФ, образует полимерные структуры, самые маленькие из которых, протофиламенты, содержат в своем составе от 30 до 40 полипептидных цепей. Поэтому после связывания сигнальной последовательности ТОМ комплексом транслокация виментина через мембрану не происходит из-за больших размеров полимера. Можно предположить, что взаимодействие виментина с митохондриями обеспечивается путем связывания его N-конца с комплексом импорта митохондриальных белков. Насколько такое взаимодействие ПФ с системой митохондриального импорта является универсальным механизмом, предстоит выяснить, однако для виментина и десмина, судя по нашим данным [6, 16, 28], такой механизм очень вероятен.

Обнаружение сигнала митохондриальной локализации на N-конце виментина позволяет сделать еще одно важное предположение: эта часть его молекулы в процессе связывания оказывается внутри митохондрии, в то время как центральный домен и С-конец остаются снаружи. Это косвенно подтверждается тем, что именно N-конец отщепляется митохондриальными протеазами в первую очередь. Наиболее вероятным ферментом, ответственным за протеолиз, по данным проведенного нами ингибиторного анализа, является атипичный кальпаин-10, который был обнаружен в матриксе и в межмембранном пространстве митохондрий [26]. Таким образом, кальпаин-10, будучи Ca²⁺-зависимым белком, может участвовать в регуляции связи виментиновых ПФ с митохондриями. Можно предположить, что при снижении мембранного потенциала митохондрий концентрация Са²⁺ в межмембранном пространстве растет, и активность кальпаина-10 увеличивается. Таким образом, связь митохондрий с ВПФ может зависеть от их мембранного потенциала. Это предположение хорошо согласуется с нашими данными о том, что в клетках мембранный потенциал подвижных не связанных с ВПФ митохондрий ниже, чем стационарных, связанных с ВПФ [30].

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-01775-а).

Соответствие принципам этики. При выделении митохондрий из печени крысы соблюдались все правила обращения с лабораторными животными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Минин А.А., Молдавер М.В. 2008. Виментиновые промежуточные филаменты и их роль во внутриклеточном распределении органелл. *Успехи биол. химии.* **48**, 221–252.
- 2. Schwarz N., Leube R.E. 2016. Intermediate filaments as organizers of cellular space: How they affect mitochondrial structure and function. *Cells.* **5** (3), 30.
- Wang N., Stamenovic D. 2000. Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, 188–194.
- Styers M.L., Kowalczyk A.P., Faundez V. 2005. Intermediate filaments and vesicular membrane traffic: The odd couple's first dance? *Traffic*. 6, 359–365.
- Ivaska J. 2011. Vimentin: Central hub in EMT induction? Small GTPases. 2, 51–53.
- 6. Chernoivanenko I.S., Matveeva E.A., Gelfand V.I., Goldman R.D., Minin A.A. 2015. Mitochondrial

membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments. *FASEB J.* **29** (3), 820–827.

- Perez-Olle R., Lopez-Toledano M.A., Goryunov D., Cabrera-Poch N., Stefanis L., Brown K., Liem R.K. 2005. Mutations in the neurofilament light gene linked to Charcot-Marie-Tooth disease cause defects in transport. *J. Neurochem.* 93, 861–874.
- Milner D.J., Mavroidis M., Weisleder N., Capetanaki Y. 2000. Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J. Cell Biol.* 150, 1283–1298.
- Kumemura H., Harada M., Yanagimoto C., Koga H., Kawaguchi T., Hanada, S., Taniguchi E., Ueno T., Sata M. 2008. Mutation in keratin 18 induces mitochondrial fragmentation in liver-derived epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 33–40.
- Tolstonog G.V., Shoeman R.L., Traub U., Traub P. 2001. Role of the intermediate filament protein vimentin in delaying senescence and in the spontaneous immortalization of mouse embryo fibroblasts. *DNA Cell Biol.* 20, 509–529.
- 11. Nicholls D.G., Budd S.L. 2000. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* **80**, 315–360.
- Pathak T., Trebak M. 2018. Mitochondrial Ca²⁺ signaling. *Pharmacol. Ther.* **192**, 112–123.
- 13. Burke P.J. 2017. Mitochondria, bioenergetics and apoptosis in cancer. *Trends Cancer.* **3** (12), 857–870.
- Rezniczek G.A., Abrahamsberg C., Fuchs P., Spazierer D., Wiche G. 2003. Plectin 5'-transcript diversity: Short alternative sequences determine stability of gene products, initiation of translation and subcellular localization of isoforms. *Hum. Mol. Genet.* 12 (23), 3181–3194.
- Winter L., Abrahamsberg C., Wiche G. 2008. Plectin isoform 1b mediates mitochondrion – intermediate filament network linkage and controls organelle shape. *J. Cell Biol.* 181 (6), 903–911.
- Nekrasova O.E., Mendez M.G., Chernoivanenko I.S., Tyurin-Kuzmin P.A., Kuczmarski E.R., Gelfand V.I., Goldman R.D., Minin A.A. 2011. Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria. *Mol. Biol. Cell.* 22, 2282–2289.
- 17. Rapaport D. 2003. Finding the right organelle: Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins. *EMBO Rep.* **4**, 948–952.
- Matveeva E.A., Venkova L.S., Chernoivanenko I.S., Minin A.A. 2015. Vimentin is involved in regulation of mitochondrial motility and membrane potential by Rac1. *Biol. Open.* 4, 1290–1297.

- Meier M., Padilla G.P., Herrmann H., Wedig T., Hergt M., Patel T.R., Stetefeld J., Aebi U., Burkhard P. 2009. Vimentin coil 1A-A molecular switch involved in the initiation of filament elongation. *J. Mol. Biol.* **390** (2), 245–261.
- Erster O., Liscovitch M. 2010. A modified inverse PCR procedure for insertion, deletion, or replacement of a DNA fragment in a target sequence and its application in the ligand interaction scan method for generation of ligand-regulated proteins. *Methods Mol. Biol.* 634, 157– 174.
- Emanuelsson O., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* 2, 953–971.
- Quirós P. M., Langer T., López-Otín C. 2015. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16 (6), 345–359.
- Ebisui C., Tsujinaka T., Kido Y., Iijima S., Yano M., Shibata H., Tanaka T., Mori T. 1994. Role of intracellular proteases in differentiation of L6 myoblast cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 32(3), 515–521.
- 24. Siklos M., Ben Aissa M., Thatcher G.R. 2015. Cysteine proteases as therapeutic targets: Does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharm. Sin. B.* **5** (6), 506–519.
- Wang K.K., Nath R., Posner A., Raser K.J., Buroker-Kilgore M., Hajimohammadreza I. 1996. An alphamercaptoacrylic acid derivative is a selective nonpeptide cell-permeable calpain inhibitor and is neuroprotective. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 6687–6692.
- Arrington D.D., Van Vleet T.R., Schnellmann R.G. 2006. Calpain 10: A mitochondrial calpain and its role in calcium-induced mitochondrial dysfunction. *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* 291 (6), 1159–1171.
- Nelson W.J., Traub P. 1983. Proteolysis of vimentin and desmin by the Ca²⁺-activated proteinase specific for these intermediate filament proteins. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1146–1156.
- Dayal A.A., Medvedeva N.V., Nekrasova T.M., Duhalin S.D., Surin A.K., Minin A.A. 2020. Desmin interacts directly with mitochondria. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (21), 8122.
- Pfanner N., Warscheid B., Wiedemann N. 2019. Mitochondrial proteins: From biogenesis to functional networks. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 20 (5), 267–284.
- Chernoivanenko I.S., Matveeva E.A., Minin A.A. 2011. Vimentin intermediate filaments increase mitochondrial membrane potential. *Biochemistry (Moscow). Supplement Series A. Membr. Cell Biol.* 5 (1), 21–28.

N-Terminal Fragment of Vimentin Is Responsible for Binding of Mitochondria In Vitro

A. A. Dayal¹, N. V. Medvedeva¹, A. A. Minin^{1, *}

¹Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia *e-mail: alexminin@gmail.com

The role of intermediate filaments in the regulation of mitochondrial functions has become obvious as a result of numerous studies in recent years. Thus, it was shown that vimentin affects the motility of mitochondria

N-КОНЦЕВОЙ ФРАГМЕНТ ВИМЕНТИНА

and their membrane potential. However, it was unclear whether it could bind mitochondria directly without any accessory proteins. In this work, bioinformatic analysis of the primary structure of vimentin in its N-terminal domain revealed a mitochondrial localization signal that may play a role in binding these organelles. To test this finding experimentally, the interaction between mitochondria isolated from rat liver and protofilaments formed by human recombinant vimentin was investigated using centrifugation through sucrose cushion. Vimentin was found to be able to bind mitochondria *in vitro*. It was shown that the N-terminal part of vimentin can be cleaved by mitochondrial proteases, resulting in the loss of interaction. Using various protease inhibitors, it was found that the atypical calpain, a Ca^{2+} -dependent cysteine protease insensitive to calpastatin, was responsible for vimentin degradation.

Keywords: mitochondria, vimentin, intermediate filaments

УДК 577.152.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИНОЛИЗИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ КУМАРИНА ПРИ ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМА С С КАРДИОЛИПИНОМ

© 2022 г. Л. А. Ромодин^{а, с,} *, Н. П. Лысенко^а, Т. Н. Пашовкин^{а, b}

^a Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – MBA имени К.И. Скрябина, Москва, 109472 Россия ^bИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия ^cГосударственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия *e-mail: rla2904@mail.ru Поступила в редакцию 13.04.2021 г. После доработки 01.07.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

Комплекс питохрома с с кардиолипином играет ключевую роль при запуске апоптоза по митохондриальному пути за счет липопероксидазной и квазилипоксигеназной активностей цитохрома с. В результате образования этого комплекса изменяется конформация цитохрома с, который приобретает свойства ферментов-пероксидаз, способных запустить реакции перекисного окисления липидов. Функции комплекса цитохрома с с кардиолипином принято изучать с помощью метода регистрации усиленной (активированной) хемилюминесценции. Усилитель, или активатор, хемилюминесценции увеличивает интенсивность свечения за счет миграции энергии электронного возбуждения с возбужденных продуктов липидной пероксидации на молекулы активатора с последующим ее высвечиванием с большим квантовым выходом. При проведении исследований целесообразно использовать активаторы, усиливающие свечение без химической реакции с компонентами исследуемой системы и сохраняющие свою концентрацию неизменной в течение времени реакции. В конце прошлого века на системе Fe^{2+} -индуцированной липидной пероксидации показали, что таковыми являются хинолизидиновые производные кумарина. При этом представления о неизменности их концентрации без дополнительных исследований переносились и на системы, в которых перекисное окисление липидов запускается ферментом-пероксидазой. Однако в настоящей работе методом спектрофотометрии на примере реакции, катализируемой комплексом цитохрома с с кардиолипином, было установлено, что хинолизидиновые производные кумарина: кумарин-314 (хинолизидин[5,6,7-gh]3-этоксикарбонилкумарин) и кумарин-334 (хинолизидин[5,6,7-gh]3-ацетилкумарин), являются непосредственными участниками ферментативной липопероксидазной реакции. На основании сравнения изменения концентрации производных кумарина в присутствии и отсутствие фосфатидной кислоты нами установлено, что производные кумарина преимущественно являются субстратами второй реакции пероксидазного каталитического цикла: восстановления ферриформы пероксидазы с двумя окисленными эквивалентами (компаунда 1) до ферриформы пероксидазы с одним окисленным эквивалентом (компаунда 2). Также мы показали, что при катализе квазилипоксигеназной реакции (в случае отсутствия H₂O₂ в системе) пероксидаза проходит через каталитический цикл по механизму одноэлектронного окисления с последующим восстановлением, при этом отсутствует стадия ферриформы пероксидазы с двумя окисленными эквивалентами (компаунда 1). Были определены константы скорости реакции первого порядка разрушения производных кумарина в ходе ферментативной липопероксидазной реакции, и на их основе выведены функции для вычисления поправочных коэффициентов, учитывающих разрушение кумариновых производных, для корректировки хемилюминограмм. полученных при изучении комплекса питохрома с с кардиолипином.

Ключевые слова: апоптоз, комплекс цитохрома *с* с кардиолипином, хемилюминесценция, спектрофотометрия, перекисное окисление липидов, производные кумарина **DOI:** 10.31857/S0232475522020062

DOI: 10.31857/S0233475522020062

введение

Апоптоз — запрограммированная клеточная гибель, характерная для многоклеточных организмов [1]. Программа апоптоза запускается в клетке двумя путями: внутренним (с участием митохондрий) и внешним (с участием рецепторов клеточной гибели). Митохондриальный механизм развития апоптоза приводит к нарушению целостности митохондриальных мембран и выхо-

Сокращения: C-314 — coumarin-314 — хинолизидин[5,6,7gh]3-этоксикарбонилкумарин; C-334 — coumarin-334 — хинолизидин[5,6,7-gh]3-ацетилкумарин; CytC — цитохром c; CytC—TOCL — комплекс цитохрома c с тетраолеоилкардиолипином; J — интенсивность хемилюминесценции; PA дилинолеоилфосфатидная кислота; TOCL — тетраолеоилкардиолипин; ε — коэффициент молярного поглощения.



Рис. 1. Схемы основных реакций каталитического пероксидазного цикла и квазилипоксигеназной реакции. *a* – Основные реакции пероксидазного цикла с квазилипоксигеназной реакцией, предположительно протекающей посредством двухэлектронного окисления пероксидазы [14]. *б* – Квазилипоксигеназная реакция по механизму одноэлектронного окисления пероксидазы. Х – атом галогена, R – апофермент, L – липид, Por – порфириновая группировка гема.

ду в цитозоль цитохрома c (CytC) [2], который выполняет роль переносчика электронов между III и IV комплексами дыхательной цепи митохондрий [3]. При попадании в цитоплазму CytC связывается с белком Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1), что приводит к развитию каскада каспазных реакций через инициаторную каспазу-9 и эффекторные каспазы-3 и -7 и в конечном итоге — к гибели клетки [6]. Помимо CytC из митохондрий выходят другие проапоптотические факторы, способствующие развитию каспаза-независимого пути развития апоптоза, такие как флавопротеин AIF (Apoptosis-inducing factor) [7] и эндонуклеаза G (EndoG) [8], вызывающие фрагментацию ядерной ДНК [9].

Следует отметить, что на начальной стадии процесса апоптоза происходит образование комплекса CytC с кардиолипином, обладающего липопероксидазной активностью, которая появляется в результате разрыва связи между гемовым железом и аминокислотным остатком Met80 при изменении конформации белка во время связывания с молекулами кардиолипина [10-12]. CvtC следует называть факультативной пероксидазой, так как свойства фермента-пероксидазы он проявляет только в определенных условиях, например, в составе комплекса с кардиолипином. Комплекс способен катализировать ряд реакций, называемых пероксидазным циклом. При этом сам механизм катализируемых в этом состоянии реакций характерен для классических пероксидаз [13]. Подробно альтернативные варианты этого механизма описаны в работах [14, 15], а основные реакции пероксидазного цикла, представлены на рис. 1а.

Окисленные состояния фермента-пероксидазы, в том числе и CytC в составе комплекса с кардиолипином, называются компаундом 1 (содержит два окисленных эквивалента) и компаундом 2 (содержит один окисленный эквивалент). Восстановление окисленных форм CytC за счет последовательных реакций одноэлектронного окисления молекул липидов приводит к образованию липидных радикалов и последующему запуску каскада реакций перекисного окисления липидов, что приводит к разрыву митохондриальной фосфолипидной мембраны [10–13].

Первой реакцией каталитического пероксидазного цикла может быть не только реакция разложения пероксида водорода, но и реакция разложения липидного гидропероксида (рис. 1а, реакция 1). Этот процесс носит название квазилипоксигеназной реакции. Однако возможен и альтернативный механизм течения квазилипоксигеназной реакции, в результате которой происходит одноэлектронное восстановление субстрата липидного гидропероксида (рис. 1б). Следует отметить, что во время настоящей липоксигеназной реакции происходит образование пероксидов полиненасыщенных жирных кислот, катализируемое ферментами-липоксигеназами, содержащими железо, но не имеющими порфиринового кольца [16].

Помимо запуска перекисного окисления липидов митохондриальных мембран, осуществляемого CytC, имеет место и неферментативный процесс, запускаемый свободными ионами железа через реакцию Фентона с последующей атакой гидроксильных радикалов на молекулы липидов [17]. Это является одним из сценариев развития некрозоподобной гибели клетки, называемой фер-



Рис. 2. Собственная (a, δ) и активированная (s) хемилюминесценция. a – Реакция диспропорционирования пероксильных радикалов [21, 22]. δ – Образование и распад диоксетановой структуры на примере диоксетанона [23]. s – Механизм активированной хемилюминесценции [22]. * – электронное возбужденное состояние.

роптозом, и впервые описанной в 2012 году в работе [18]. По данным авторов [19], именно по механизму ферроптоза происходит гибель стволовых клеток костного мозга при действии на них ионизирующей радиации.

Процесс перекисного окисления липидов изучают методом регистрации хемилюминесценции [20]. Метод заключается в регистрации сверхслабого свечения, образующегося при реакции диспропорционирования липопероксильных радикалов [21, 22] по механизмам, представленным на рис. 2.

Внесение в систему вещества, называемого усилителем, или активатором, хемилюминесценции, перехватывающего электронные возбужденные состояния у продуктов реакции и испускающего фотоны с более высоким квантовым выходом, облегчает изучение процесса перекисного окисления липидов, в особенности, если электронное возбуждение на молекулу активатора хемилюминесценции переносится без химического взаимодействия с компонентом системы, а также, если этот активатор усиливает только хемилюминесценцию, которая возникает при реакциях с участием именно радикалов липидов.

В 1990-х годах на модельной системе, в которой происходило перекисное окисление липидов, катализируемое свободными ионами Fe^{2+} , в качестве усилителей хемилюминесценции использовались хинолизидиновые производные кумарина, которые не расходовались в ходе реакции [24, 25]. Вывод о химической инертности по отношению к компонентам системы переносился без дополнительной проверки на системы, где пероксидация липидов запускалась ферментативно [20].

Поэтому мы исследовали свойства хинолизидиновых производных кумарина в системе, в которой происходит пероксидазная реакция, катализируемая комплексом цитохрома с с кардиолипином. В этой работе изучались хинолизидин[5,6,7-gh]3-этоксикарбонилкумарин, называемый кумарин-314 (С-314), и хинолизидин[5,6,7gh]3-ацетилкумарин, называемый кумарин-334 (С-334), в системе, в которой катализ квазилипоксигеназной и липопероксидазной реакций осуществлялся комплексом цитохрома с с тетраолеоилкардиолипином (CytC-TOCL). Ранее авторы [26] отмечали, что другое производное кумарина хинолизидин[5,6,7-gh]3,2'-бензимидазолилкумарин (известный как кумарин-525) - является нестабильным при ферментативной липидной пероксилации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей работе использовались следующие реактивы: KH_2PO_4 (Реахим, Россия), 20 мМ (pH 7.4); пероксид водорода, 8.6 М водный раствор (Sigma-Aldrich, США); С-314, 500 мкМ метанольный раствор (Sigma-Aldrich); С-334, 500 мкМ метанольный раствор (Sigma-Aldrich); СуtС, 1 мМ раствор в фосфатном буфере (Sigma-Aldrich); 1,1',2,2'-тетраолеоилкардиолипин (TOCL), 6 мМ метанольный раствор (Avanti Polar Lipids, США); дилинолеоилфосфатидная кислота (PA), 12 мМ метанольный раствор (Avanti Polar Lipids).

Регистрация серии спектров поглощения смеси. Спектры поглощения регистрировались с использованием аппаратно-программного комплекса на основе спектрофотометра СФ-10 (ЛОМО, Россия). В кювету спектрофотометра были добавлены растворы: СуtС, ТОСL, С-314 или С-334, РА. Для изучения пероксидазной реакции в последнюю очередь вносили раствор пероксида водорода. Общий объем пробы составлял 3 мл, до нужного объема раствор доводился добавлением 20 мМ фосфатного буфера. Параметры регистрации спектров поглощения: диапазон измерения 300–600 нм, скорость измерения 5 нм/с, шаг сканирования ($\Delta\lambda$) 0.5 нм, ширина щели 5 нм.

Концентрации веществ в начале квазилипоксигеназной реакции составляли: 11.1 мкМ СуtС, 333.3 мкМ ТОСL, 666.7 мкМ РА, 50 мкМ С-314 или 30 мкМ С-334. В начале липопероксидазной реакции: 10 мкМ СуtС, 300 мкМ ТОСL, 45 мкМ С-314 или 25 мкМ С-334, начальная концентрация пероксида водорода в экспериментах с С-314 составляла 380 мкМ, с С-334 – 215 мкМ, концентрация РА в начале липопероксидазной реакции составляла ≈550 мкМ. Объемы растворов и данные концентрации РА и пероксида водорода были подобраны нами по результатам подготовительных экспериментов, а концентрации CytC и TOCL взяты с расчетом на оптимальное их соотношение, равное 1 : 30, показанное в работе [13].

Алгоритм спектрофотометрических измерений и выведение концентраций производного кумарина и цитохрома *с* соответствует запатентованной методике [27], которая заключается в регистрации серии спектров в диапазоне длин волн 300–600 нм со следующими временными промежутками между измерениями: с первого по шестое измерения — 10 с, с 6-го по 29-е — 60 с и с 29 по 55-е — 120 с. При этом в эксперименте по изучению участия С-334 в липопероксидазной реакции интервал между первым и вторым измерениями был увеличен, что видно из данных на рис. 3*г*. Впоследствии на основании полученных спектров были вычислены концентрации веществ в соответствующие моменты времени реакции.

Вычисление концентраций проводилось для смеси, состоящей только из двух веществ: производного кумарина и СуtС. Однако такое упрощение не вносит искажения в результат вычисления, так как на рассматриваемых длинах волн TOCL, РА и пероксид водорода имеют низкие значения оптической плотности, и практически весь вклад в общее поглощение смеси в диапазоне длин волн 405–465 нм вносят СуtС и кумариновое производное.

Регистрация хемилюминесценции. Исследования по измерению хемилюминесценции проводились на хемилюминометре Lum-100 (DISoft, Россия), подключенном к компьютеру с программным обеспечением PowerGraph. Состав реакционной смеси был идентичен приведенному для спектрофотометрических измерений, но общий объем смеси в экспериментах по регистрации хемилюминесценции был равен 1 мл.

Статистика. Статистическая обработка результатов эксперимента производилась средствами MS Excel с использованием *t*-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считаются различия при p = 0.95; n = 5, где n — количество повторений для каждой серии экспериментов. Данные представлены в виде: среднее арифметическое результатов \pm предельная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе экспериментов было показано, что хинолизидиновые производные кумарина являются субстратами CytC, проявляющего пероксидазную активность в результате образования комплекса с кардиолипином. На рис. 3 приведены результаты измерения хемилюминесценции и графики изменения концентрации производных



Рис. 3. Изменения концентраций производных кумарина (*1*) и интенсивности хемилюминесценции (*J*) в системе CytC–TOCL (*2*). a - C-314 в присутствии PA, $\delta - в$ присутствии PA и H₂O₂, e - C-334 в присутствии PA, e - C-334 в присутствии PA, e - C-334 в присутствии PA и H₂O₂.

кумарина. Значения концентрации вычислены на основании величины оптической плотности реакционной смеси в соответствии с уравнением закона Бугера–Ламберта–Бера для смеси веществ при применении метода Фирордта – вычисления концентраций на основании значений оптической плотности смеси при двух длинах волн: 409 нм ($\varepsilon_{CytC} = 90740 \text{ л/моль см}$, $\varepsilon_{C-314} =$ = 12562 л/моль см, $\varepsilon_{C-334} = 9240 \text{ л/моль см}$) и в экспериментах с C-314: 447.5 нм ($\varepsilon_{CytC} =$ = 13 890 л/моль см, $\varepsilon_{C-314} = 32360 \text{ л/моль см}$), в экспериментах с C-334: 460 нм ($\varepsilon_{CytC} =$ = 8620 л/моль см, $\varepsilon_{C-334} = 44012 \text{ л/моль см}$). Указанные коэффициенты молярного поглощения определены нами для среды 20 мМ фосфатного буфера на предварительном этапе исследования.

На рис. 3 показано, что концентрация хинолизидиновых производных кумарина не уменьшается в процессе квазилипоксигеназной реакции (рис. 3a, 3a). При этом происходит разрушение С-314 и С-334 в присутствии пероксида водорода, что может быть вызвано действием CytC—TOCL (рис. 36, 3c), поскольку производные кумарина не разрушаются при действии H₂O₂ [28] и во время неферментативной реакции перекисного окисления липидов [24—26].

Спад вспышки люминесценции, наблюдаемой во время квазилипоксигеназной реакции, не сопровождается уменьшением концентрации кумариновых производных. Это говорит о том, что уменьшение интенсивности хемилюминесценции в данном случае обусловлено прекращением радикальной реакции в системе, а не расходованием усилителя хемилюминесценции. Можно предположить, что хемилюминесценция вызвана не разрушением активатора, а физическим процессом миграции электронного возбуждения с возбужденных кетонов – продуктов перекисного окисления липидов [21, 22] – на молекулы C-314 и C-334.

В случае липопероксидазной реакции (рис. 3*б*, 3*г*), руководствуясь только спадом вспышки хемилюминесценции, нельзя говорить о снижении интенсивности реакции перекисного окисления липидов, так как при этом происходит резкое снижение концентрации усилителя хемилюминесценции, что ведет за собой и спад люминесценции. Хотя при этом интенсивность липидной пероксидации в образце может оставаться попрежнему на высоком уровне.

Для интерпретации данных о скорости запускаемой ферментом-пероксидазой реакции перекисного окисления липидов необходимо корректировать хемилюминограмму. Для этого была выведена корректирующая функция, учитывающая уменьшение концентрации кумариновых производных в ходе ферментативной липидной пероксидации. В первую очередь были определены константы скорости реакции разрушения этих веществ.

Несмотря на то, что непосредственного взаимодействия производных кумарина с H_2O_2 нет [28], рассматриваемую реакцию можно в упрощенном виде представить как окисление производного кумарина пероксидом водорода, которое катализирует CytC–TOCL:

Упрощенно рассматривая CytC как катализатор, пренебрегая его участием в данной реакции, константу скорости окисления производного кумарина можно вычислять как константу скорости реакции первого порядка, так как концентрация пероксида водорода в нашей системе более чем в 8 раз превосходит концентрацию производного кумарина.

Константы скорости реакции первого порядка для разрушения С-314 и С-334 под действием CytC-TOCL (соотношение белок : липид равно 1:30), катализирующего реакцию окисления РА под действием H₂O₂, в начале реакции составляют $0.0027 \pm 0.0006 \text{ c}^{-1}$ и $0.0044 \pm 0.0027 \text{ c}^{-1}$ соответственно. Однако в силу того, что моделирование кинетики расходования производных кумарина как реакции первого порядка условно, с течением времени происходит расхождение между теоретическими и эмпирическими значениями концентрации производных кумарина в системе. Поэтому указанные выше значения констант скорости разрушения производных кумарина адекватны только для первых 300 с в случае с С-314 и 230 с в случае с С-334. Мы определили технические константы скорости разрушения производных кумарина в процессе катализируемой CytC-TOCL липопероксидазной реакции и для других временны́х отрезков. Для С-314 — это 0.00039 ± $\pm 0.00012 c^{-1}$ на временном промежутке от 300 до 570 с и 0.00014 ± 0.00002 с⁻¹ на промежутке от 570 до 1200 с. Для C-334 — это 0.0013 ± 0.0002 с⁻¹ на временном промежутке от 230 до 580 с и $0.0006 \pm$ $\pm 0.0001 \text{ c}^{-1}$ на промежутке от 580 до 930 с.

По причине снижения концентрации производных кумарина в системе, в которой происходит катализируемое комплексом CytC с кардиолипином перекисное окисление липидов, интенсивность хемилюминесценции падает. Вследствие этого может быть сделан ложный вывод о снижении интенсивности свободнорадикальных реакций. И в случае, к примеру, изучения влияния на этот процесс антиоксидантов, можно прийти к ошибочному представлению об их эффективности. Во избежание этого следует умножать значения интенсивности хемилюминесценции, зарегистрированные прибором, на специальные поправочные коэффициенты. Тогда интенсивность свечения приобретет такое значение, какое бы у нее было в случае химической инертности производного кумарина.

Данные поправочные коэффициенты равны отношению единицы и значения доли концентрации усилителя хемилюминесценции, остающейся в системе в конкретный момент времени. Функция для их вычисления таким образом получается равной обратной функции необратимой химической реакции первого порядка, где начальная концентрация принята за единицу:

$$K_{\rm Cor} = \frac{C_0}{C} = \frac{1}{e^{-kt}} = e^{kt},$$

где $K_{\text{Сог}}$ — поправочный коэффициент, t — время от начала реакции, C_0 — начальное значение концентрации производного кумарина, C — значение концентрации производного кумарина в момент времени t, k — константа скорости первого порядка разрушения кумаринового производного, e — основание натурального логарифма.

Для получения откорректированного значения интенсивности хемилюминесценции (J_{Cor}) в момент времени *t* следует умножить зарегистрированные значения интенсивности хемилюминесценции (J_{Ex}) на поправочные коэффициенты для соответствующих моментов времени:

$$J_{\rm Cor} = J_{\rm Ex} K_{\rm Cor}.$$

Однако в связи с тем, что различным временным диапазонам от начала реакции соответствуют различные значения эффективной константы скорости разрушения усилителя хемилюминесценции, в уравнение, описывающее общий вид поправочной функции, необходимо также ввести дополнительный коэффициент А. Он равен отношению единицы к значению доли концентрации усилителя хемилюминесценции, остающейся в системе в момент времени, равный первому значению временного диапазона, для которого актуальна эффективная техническая константа скорости реакции разрушения производного кумарина k. Поэтому в общем виде уравнение поправочной функции будет выглядеть следующим образом:

$$J_{\text{Cor}} = A J_{\text{Ex}} e^{kt}$$
 при $t \in (t_1; t_2],$

где t_1 и t_2 – границы временно́го диапазона, для которого актуально значение эффективной константы скорости разрушения кумаринового производного k; A – эффективная константа для временно́го диапазона (t_1 ; t_2]: при $t_1 = 0$ A = 1, а при $t_1 > 0$ A > 1.

Корректирующие функции для обработки результатов измерения интенсивности хемилюминесценции в системе CytC-TOCL-H₂O₂-PA при соотношении CytC-TOCL 1 : 30 имеют следующий вид:

Для С-314:

 $J_{\text{Cor}} = J_{\text{Ex}} e^{0.0027t} \text{ при } t \in (0;300] \text{ с,}$ $J_{\text{Cor}} = 2.0081 J_{\text{Ex}} e^{0.00039t} \text{ при } t \in (300;570] \text{ с,}$ $J_{\text{Cor}} = 2.3115 J_{\text{Ex}} e^{0.00014t} \text{ при } t \in (570;1200] \text{ c.}$ Для C-334:

$$\begin{split} J_{\rm Cor} &= J_{\rm Ex} {\rm e}^{0.0044t} \ {\rm пр} {\rm u} \ t \in (0;230] \ {\rm c}, \\ J_{\rm Cor} &= 1.9983 J_{\rm Ex} {\rm e}^{0.0013t} \ {\rm пр} {\rm u} \ t \in (230;580] \ {\rm c}, \\ J_{\rm Cor} &= 2.9327 J_{\rm Ex} {\rm e}^{0.0006t} \ {\rm пр} {\rm u} \ t \in (580;930] \ {\rm c}. \end{split}$$

При этом вместо использования корректирующей функции также возможно использовать таблицу поправочных коэффициентов, соответствующих определенным моментам времени от начала реакции и вычисленных как отношение начальной концентрации производного кумарина к значению концентрации в соответствующее время от начала реакции. Однако в этом случае станет возможной лишь корректировка значений интенсивности хемилюминесценции в те конкретные моменты времени, для которых известно значение поправочного коэффициента.

Применение представленных выше корректирующих функций подразумевает линейную зависимость интенсивности хемилюминесценции от концентрации производных кумарина. Нелинейный характер этой зависимости может наблюдаться в случае, если взаимодействие производного кумарина с пероксидазой, в роли которой выступает связанный с кардиолипином СуtС, сопровождается люминесценцией. Подобное свечение имеет место в случае люминола – наиболее часто используемого хемилюминесцентного зонда [29].

Однако в работе Г.К. Владимирова описывается, что окисление производного кумарина пероксидазой, в роли которой выступает СуtС, люминесценцией не сопровождается [30]. Поэтому взаимодействие кумариновых красителей с СуtС вызывает снижение интенсивности хемилюминесценции, которое адекватно корректируется поправочной функцией, предлагаемой нами.

При этом вся люминесценция обусловлена процессом липидной пероксидации. Во время взаимодействия производного кумарина с возбужденным продуктом перекисного окисления липидов происходит только миграция энергии электронного возбуждения на молекулу кумаринового красителя без химической деградации последней с последующем высвечиванием этой энергии в виде фотона. Усиление свечения достигается за счет того, что квантовый выход люминесценции при переходе молекулы кумаринового красителя из возбужденного состояния в основное намного выше, чем для аналогичного процесса у возбужденных продуктов липидной пероксидации - по механизму усиления свечения производные кумарина являются физическими усилителями (активаторами) хемилюминесценции [29]. Для данных веществ действует правило, описанное в работах А.И. Журавлёва [31, 32], согласно которому, в присутствии активатора хемилюминесценции свечение усиливается в такое число раз, которому соответствует величина, равная произведению концентрации усилителя хемилюминесценции на коэффициент усиления, зависящий от природы вещества. Формула действует лишь в случаях, если экспериментальная модельная система легко проницаема для света и фотоны активно не поглощаются ее компонентами или стенками кюветы.

Таким образом, производные кумарина являются средством, увеличивающим интенсивность хемилюминесценции, сопровождающей перекисное окисление липидов. Но в случае, если этот процесс запускается ферментом-пероксидазой. в том числе и CvtC. связанным с кардиолипином. под его действием происходит снижение концентрации производных кумарина. Так как взаимодействие производных кумарина с CytC не сопровождается свечением [30], то для приведения хемилюминограммы в вид, какой бы она имела в случае полной химической инертности производных кумарина в системе, достаточно лишь умножить фактическое значение интенсивности свечения на поправку на снижение концентрации усилителя хемилюминесценции.

На рис. 4*a* сравнивается хемилюминесцентная кривая, зарегистрированная на хемилюминометре, с хемилюминесцентной кривой, полученной путем ее корректировки с учетом расходования усилителя хемилюминесценции. Кривая 2 — это интенсивность хемилюминесценции в случае, если бы концентрация активатора хемилюминесценции не уменьшалась в ходе реакции. Кривая 2 позволяет оценить реальную скорость липидной пероксидации реакции, протекающей в образце.

Указанные выше корректирующие функции необходимо применять в исследованиях, связанных с активностью комплекса цитохрома *с* кардиолипином, к примеру, при исследовании действия антиоксидантов на катализируемую им липидную пероксидацию. Так как в противном случае уменьшение интенсивности хемилюминесценции, происходящее по причине расходования ее усилителя, можно ошибочно расценить как результат действия антиоксиданта.

Для ответа на вопрос, на какой стадии пероксидазного каталитического цикла происходит реакция производного кумарина с пероксида-



Рис. 4. Интенсивность хемилюминесценции и схема пероксидазного каталитического цикла в присутствии производного кумарина. a - Интенсивность хемилюминесценции (J) в системе начального состава: 10 мкМ СуtС, 300 мкМ ТОСL, 550 мкМ РА, 25 мкМ С-314, 215 мкМ H₂O₂, измеренная хемилюминометром (I) и откорректированная с учетом поправки на уменьшение концентрации C-314 (2). $\delta - Пероксидазный каталитический цикл в присутствии производного кумарина: хинолизидиновое производное кумарина подвергается окислению под действием компаунда 1, а при превращении компаунда 2 в феррицитохром <math>c$ окислению подвергается молекула липида. L - липид, R - апофермент-пероксидаза, Рог – порфириновая группировка гема в составе пероксидазы.

зой, были проведены эксперименты совместно с коллегами из МГУ имени М.В. Ломоносова: Ю.А. Владимировым, Г.К. Владимировым и Е.И. Демиховым. На основании этих экспериментов была выдвинута гипотеза, согласно которой хинолизидиновые производные кумарина являются восстанавливающими субстратами формы феррицитохрома *с* с двумя и с одним окисленным эквивалентом (компаунда 1 и компаунда 2) [33]. Однако вывод был сделан при изучении пероксидазной реакции без внесения в систему легкоокисляемого липидного субстрата.

На графиках, представленных на рис. 3, видно, что в ходе квазилипоксигеназной реакции производное кумарина практически не расходуется, однако его концентрация существенно снижается в ходе липопероксидазной реакции. На основании этого было сделано два вывода. Первый вывод: производное кумарина взаимодействует только с феррицитохромом с с двумя окисленными эквивалентами (компаундом 1), а феррицитохром c с одним окисленным эквивалентом (компаунд 2) реагирует только с липидными молекулами. Второй вывод: квазилипоксигеназная реакция катализируется ферментом-пероксидазой посредством не двухэлектронного, а одноэлектронного окисления феррицитохрома c (образуется сразу компаунд 2, а стадия компаунда 1 минуется) с последующим восстановлением посредством радикального окисления липидной молекулы. Графически предполагаемый нами механизм катализа квазилипоксигеназной реакции представлен на рис. 1б. Основной механизм участия производного кумарина в пероксидазном цикле представлен на рис. 4б.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что хинолизидиновые производные кумарина в системах, в которых протекает ферментативная липопероксидазная реакция, являются субстратами ферментапероксидазы, в роли которого в нашей работе выступал комплекс цитохрома с с кардиолипином. Причем производное кумарина окисляется во время реакции превращения ферриформы пероксидазы с двумя окисленными эквивалентами в форму с одним окисленным эквивалентом – компаунда 1 в компаунд 2. Определены константы скорости псевдопервого порядка для реакций разрушения С-314 и С-334 под действием СуtС-ТОСL в присутствии H_2O_2 , составившие для первых минут реакции $0.0027 \pm 0.0006 \text{ c}^{-1}$ и $0.0044 \pm$ $+ 0.0027 c^{-1}$ соответственно.

Используя поправку на разрушение производных кумарина, можно обрабатывать хемилюминограммы, придавая им такой вид, как если бы кумариновые производные не расходовались в процессе реакции. В настоящей работе нами были выведены эти поправочные функции, при использовании которых станет возможно адекватно интерпретировать данные о скорости радикальных реакций с участием липидов, в том числе и при воздействии на систему различными факторами, например, антиоксидантами.

Также была выдвинута гипотеза, согласно которой квазилипоксигеназную реакцию ферментпероксидаза катализирует через механизм одноэлектронного окисления фермента (через превращение ферриформы пероксидазы в компаунд 2, отличающийся от нее одним окисленным эквивалентом).

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена с использованием средств базового бюджетного финансирования и личных средств авторов.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **26** (4), 239–257. https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33
- 2. Skulachev V.P. 1996. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett.* **397** (1), 7–10.
- Kalpage H.A., Bazylianska V., Recanati M.A., Fite A., Liu J., Wan J., Mantena N., Malek M.H., Podgorski I., Heath E.I., Vaishnav A., Edwards B.F., Grossman L.I., Sanderson T.H., Lee I., Huttemann M. 2019. Tissuespecific regulation of cytochrome *c* by post-translational modifications: Respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis. *FASEB J.* 33 (2), 1540–1553.

https://doi.org/10.1096/fj.201801417R

- Cain K., Bratton S.B., Langlais C., Walker G., Brown D.G., Sun X.M., Cohen G.M. 2000. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. J. Biol. Chem. 275 (9), 6067–6070.
- 5. Shakeri R., Kheirollahi A., Davoodi J. 2017. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie*. **135**, 111–125.

https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.02.001

 McComb S., Chan P.K., Guinot A., Hartmannsdottir H., Jenni S., Dobay M.P., Bourquin J.P., Bornhauser B.C. 2019. Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or -7. *Sci. Adv.* 5 (7), eaau9433. https://doi.org/10.1126/sciadv.aau9433

 Susin S.A., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Costantini P., Ferri K.F., Irinopoulou T., Prevost M.C., Brothers G., Mak T.W., Prevost M.C. Brothers G. 2000 T.,

- Penninger J., Earnshaw W.C., Kroemer G. 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 192 (4), 571–580.
 8. Bemani P., Mohammadi M., Hakakian A. 2018. Anti-
- ROR1 scFv-EndoG as a novel anti-cancer therapeutic drug. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **19** (1), 97–102. https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.1.97
- Li S., Wang T., Zhai L., Ge K., Zhao J., Cong W., Guo Y. 2018. Picroside II exerts a neuroprotective effect by inhibiting mPTP permeability and EndoG release after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. J. Mol.

Neurosci. **64** (1), 144–155. https://doi.org/10.1007/s12031-017-1012-z

- Kagan V.E., Tyurin V.A., Jiang J., Tyurina Y.Y., Ritov V.B., Amoscato A.A., Osipov A.N., Belikova N.A., Kapralov A.A., Kini V.V., Vlasova I.I., Zhao Q., Zou M., Di P., Svistunenko D.A., Kurnikov I.V., Borisenko G.G. 2005. Cytochrome *c* acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nature Chem. Biol.* 1, 223–232.
- Kobayashi H., Nagao S., Hirota S. 2016. Characterization of the cytochrome *c* membrane-binding site using cardiolipin-containing bicelles with NMR. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 55 (45), 14019–14022. https://doi.org/10.1002/anie.201607419
- Li M., Mandal A., Tyurin V.A., DeLucia M., Ahn J., Kagan V.E., P.C.A. van der Wel. 2019. Surface-binding to cardiolipin nanodomains triggers cytochrome *c* proapoptotic peroxidase activity via localized dynamics. *Structure*. 27 (5), 806–815. https://doi.org/10.1016/j.str.2019.02.007
- Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Алексеев А.В. 2013. Молекулярные механизмы апоптоза. Структура комплекса цитохрома *с* с кардиолипином. *Биохимия*. **78** (10), 1391–1404.
- Furtmuller P.G., Jantschko W., Zederbauer M., Jakopitsch C., Arnhold J., Obinger C. 2004. Kinetics of interconversion of redox intermediates of lactoperoxidase, eosinophil peroxidase and myeloperoxidase. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57 (5), 830–831.
- Rodriguez-Lopez J.N., Lowe D.J., Hernandez-Ruiz J., Hiner A.N., Garcia-Canovas F., Thorneley R.N. 2001. Mechanism of reaction of hydrogen peroxide with horseradish peroxidase: Identification of intermediates in the catalytic cycle. *J. Amer. Chem. Soc.* 123 (48), 11838–11847.
- Nelson M.J., Seitz S.P. 1994. The structure and function of lipoxygenase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4 (6), 878–884. https://doi.org/10.1016/0959-440x(94)90270-4
- Chen G., Guo G., Zhou X., Chen H. 2020. Potential mechanism of ferroptosis in pancreatic cancer. *Oncol. Lett.* 19 (1), 579–587. https://doi.org/10.3892/ol.2019.11159
- Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R., Skouta R., Zaitsev E.M., Gleason C.E., Patel D.N., Bauer A.J., Cantley A.M., Yang W.S., Morrison B., Stockwell B.R. 2012. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* **149** (5), 1060–1072. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042
- Zhang X., Xing X., Liu H., Feng J., Tian M., Chang S., Liu P., Zhang H. 2020. Ionizing radiation induces ferroptosis in granulocyte-macrophage hematopoietic progenitor cells of murine bone marrow. *Int. J. Radiat. Biol.* 96 (5), 584–595. https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1708993
- Дёмин Е.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. 2008. Антиоксидантное действие дигидрокверцетина и рутина в пероксидазных реакциях, катализируемых цитохромом с. Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия. 49 (5), 354–360.
- Russell G.A. 1957. Deuterium-isotope effects in the autoxidation of aralkyl hydrocarbons. Mechanism of the interaction of peroxy radicals. J. Amer. Chem. Soc. 79 (14), 3871–3877. https://doi.org/10.1021/ja01571a068
- Belyakov V.A., Vassil'ev R.F. 1970.Chemiluminescence in hydrocarbon oxidation in solution. A quantitative study of the excitation and emission steps. *Photochem. Photobiol.* **11** (3), 179–192. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1970.tb05986.x
- Cilento G., Adam W. 1995. From free radicals to electronically excited species. *Free Radic. Biol. Med.* 19 (1), 103–114. https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00002-f
- Владимиров Ю.А., Шерстнёв М.П., Азимбаев Т.К. 1995. Активированная кумарином хемилюминесценция липопротеидов низкой плотности в присутствии ионов двухвалентного железа. Биофизика. 40 (2), 323–327.
- Vladimirov Yu.A., Sharov V.S., Driomina E.S., Reznitchenko A.V., Gashev S.B. 1995. Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 18 (4), 739–745.
- Sharov V.S., Briviba K., Sies H. 1996. Assessment of the C-525 laser dye as a chemiluminescence sensitizer for lipid peroxidation in biological membranes: A comparison with chlorophyll-*a. Free Radic. Biol. Med.* 21 (6), 833–843.
- Ромодин Л.А., Трифонова М.Ф., Лысенко Н.П., Бекузарова С.А. 2020. Способ определения химического участия активатора хемилюминесценции в ли-

попероксидазной реакции. Патент РФ № 2720807. Заявл. 04.06.2019, опубл. 13.05.2020.

- 28. Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П. 2019. Качественная оценка взаимодействия между различными компонентами реакционной смеси, используемой для изучения липопероксидазной активности комплекса цитохрома с с кардиолипином. Матер. XI Межд. научно-практической конф. "Трансформация опыта менеджмента агробизнеса Европейского Союза в Казахстан и страны Центральной Азии", "Дулатовские чтения – 2019", с. 61–68.
- 29. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. 2009. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Усп. биол. химии.* **49**, 341–388.
- Владимиров Г.К. 2018. Структура и пероксидазная функция комплекса цитохрома с с кардиолипином в водной среде и в неполярном окружении. Дис. ... канд. биол. наук. М.: РНИМУ им. П.И. Пирогова M3 РФ. 2018. 125 с.
- Журавлёв А.И. 2009. Квантовая биофизика животных и человека: Учебное пособие. 3-е издание. М.: МГАВМиБ. 474 с.
- Журавлёв А.И., Зубкова С.М. 2014. Антиоксиданты. Свободнорадикальная патология, старение. 2-е издание. М.: Белые альвы. 304 с.
- Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Шангин С.В., Владимиров Г.К., Лысенко Н.П., Демихов Е.И. 2020. Изохинолизиновые производные кумарина в качестве активаторов хемилюминесценции в реакциях липидной пероксидации. Биофизика. 65 (4), 680–690.

https://doi.org/10.31857/S0006302920040080

The Use of Quinolizidine Derivatives of Coumarin in Studies of the Mechanisms of Action of the Cytochrome c-Cardiolipin Complex

L. A. Romodin^{1, 3, *}, N. P. Lysenko¹, T. N. Pashovkin^{1, 2}

¹Skryabin Moscow State Academy of Veterinarian Medicine and Biotechnology, Moscow, 109472 Russia ²Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia ³The A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of the FMBA of Russia, Moscow, Russia

*e-mail: rla2904@mail.ru

Complex cytochrome *c*-cardiolipin plays a crucial role in triggering apoptosis via the mitochondrial pathway due to lipoperoxidase and quasi-lipoxygenase activities of cytochrome *c*. As a result of the formation of this complex, the conformation of cytochrome *c* changes. It acquires the properties of peroxidase enzymes capable of triggering lipid peroxidation reactions. The functions of the cytochrome *c*-cardiolipin complex are usually studied by the method of recording enhanced (activated) chemiluminescence. The chemiluminescence amplifier or activator increases the luminescence intensity due to the migration of the electron excitation energy from the excited lipid peroxidation products to the activator molecules, followed by its illumination with a large quantum yield. For research, it is advisable to use the activators that enhance the glow without a chemical reaction with the components of the studied system and maintain the same concentration during the reaction time. At the end of the 20th century, it was shown on the Fe²⁺-induced lipid peroxidation system that these are quinolizidine derivatives of coumarin. It should be noted that the ideas of the concentration immutability were transferred to systems, in which lipid peroxidation is triggered by the enzyme peroxidase, without additional studies. However, in this work, using the example of a reaction catalyzed by a complex of cytochrome *c* with cardiolipin, it was shown by spectrophotometry that quinolizidine derivatives of coumarin. and coumarin-334 (quin-

РОМОДИН и др.

olizidine [5,6,7-gh]3-acetylcumarin), are direct participants in the enzymatic lipoperoxidase reaction. Based on a comparison of changes in the concentration of coumarin derivatives in the presence and absence of phosphatidic acid, we found that coumarin derivatives are predominant substrates of the second reaction of the peroxidase catalytic cycle: reduction of a peroxidase ferriform with two oxidized equivalents (Compound 1) to a peroxidase ferriform with one oxidized equivalent (Compound 2). It was also shown that during the catalysis of a quasi-hypoxygenase reaction (in the absence of H_2O_2 in the system), peroxidase passes through a catalytic cycle by the mechanism of one-electron oxidation followed by reduction, while there is no ferriform stage of peroxidase with two oxidized equivalents (Compound 1). The rate constants of the first-order reaction of the destruction of coumarin derivatives during the enzymatic lipoperoxidase reaction were determined. Then, on this basis, considering the destruction coumarin derivatives, we derived functions for calculating the correction coefficients for correcting chemiluminograms obtained during the study of the complex cytochrome *c*-cardiolipin.

Keywords: apoptosis, cytochrome c-cardiolipin complex, chemiluminescence, spectrophotometry, lipid peroxidation, coumarin derivatives

234

УДК 577.322.7'352.42

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВОГО ПОРИНА ИЗ МОРСКОЙ БАКТЕРИИ Marinomonas primorvensis

© 2022 г. Д. К. Чистюлин^{а,} *, Е. А. Зелепуга^а, В. А. Хоменко^а, О. Ю. Портнягина^а, О. Д. Новикова^а

^аТихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН им. Г.Б. Елякова, Владивосток, 690022 Россия *e-mail: cdk27@mail.ru Поступила в редакцию 18.11.2021 г. После доработки 13.12.2021 г. Принята к публикации 14.12.2021 г.

С помощью метода реконструкции белка в плоские бислойные липидные мембраны охарактеризованы электрофизиологические свойства канала нового порина из морской бактерии *Marinomonas primoryensis* (MpOmp). Определены основные характеристики: величина проводимости одиночного канала MpOmp, его селективность и значения критического потенциала закрытия в различных средах (нейтральной, слабокислой, щелочной). С помощью *in silico* подхода предсказаны геометрические характеристики поры MpOmp и распределение зарядов в устье и внутри поринового канала.

Ключевые слова: морские бактерии, *Marinomonas primoryensis*, порообразующие белки DOI: 10.31857/S0233475522030045

введение

Молекулярные механизмы адаптации живых организмов, которые обеспечивают их существование в экстремальных условиях, очень плохо изучены. Многие процессы в океанических экосистемах напрямую связаны с морскими бактериями: регуляция скорости минерализации органических источников, круговорот питательных веществ и перенос энергии [1]. В свою очередь, различные факторы окружающей среды, такие как осмолярность, температура и дефицит фосфата, могут существенно влиять на изменения в геноме морских бактерий, в том числе на экспрессию порообразующих белков наружной мембраны бактерий, осуществляющих в клетке транспортную функцию [2, 3].

В отличие от неспецифических поринов наземных бактерий [4] транспортные белки морских микроорганизмов изучены недостаточно. Остаются невыясненными многие аспекты функционирования морских поринов, в частности механизм потенциал-зависимого стробирования канала и/или его закрытия при увеличении кислотности среды, что характерно для поринов наземных бактерий. В отсутствии теоретических моделей морских поринов не известны особенности распределения зарядов внутри поры этих белков, напрямую связанные с проводимостью бактериальной мембраны. Исследование свойств порообразующих белков является важным не только для расширения фундаментальных знаний в области биофизики белка, но и может представлять интерес для биоинженерии, поскольку открывают возможность создания новых сенсорных систем на основе искусственных пор с уникальными свойствами.

В данной работе с помощью методов, основанных на использовании бислойных липидных мембран (БЛМ) определены электрофизиологические характеристики канала, образованного порином из психрофильной морской бактерии *Marinomonas primoryensis* KMM 3633^T (MpOmp). Белок получен из бактерии, выделенной из природного резервуара в Тихом океане [5].

Как показали наши исследования [6], в соответствии с анализом консервативных доменов МрОтр был классифицирован как Porin_4. Он является единственным порином в геноме бактерии *M. primoryensis* KMM 3633^T, подобным неспецифическим поринам наземных грамотрицательных бактерий. Однако аминокислотный состав МрОтр отличается более высоким содержанием кислых аминокислот и отсутствием остатков триптофана. Нативный МрОтр существует в виде тримера с молекулярной массой около 94 кДа, что близко по значению к таковой других поринов морских протеобактерий. Обнаружено, что олигомерная структура МрОтр, в отличие от поринов наземных бактерий, чрезвычайно нестабильна к действию температуры. Диссоциация тримеров белка наблюдается уже при 30°С [6]. Эти особенности структуры и физико-химических свойств делают МрОтр интересным объектом для электрофизиологических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка порина. Для получения олигомерной формы MpOmp были использованы микробные клетки *M. primoryensis* KMM 3633^T, выращенные при температуре 6–8°С. Процедура выделения клеточных оболочек и получения целевого белка в виде нерастворимого в саркозиле осадка в деталях описана в работе [6].

Электрофизиологические эксперименты. Ячейку заполняли буферным раствором, содержащим 10 мМ Трис, 10 мМ MES, 10 мМ бета-аланина и 1 или 0.1 M KCl, оттитрованным разбавленной HCl до рН 8.5, 7.0 и 5.5. БЛМ формировали по методу Мюллера-Рудина [7] из раствора дифитаноилфосфатидилхолина (DPhPC) в н-гептане (5 мг/мл) в тефлоновых ячейках, разделенных перегородкой с отверстием диаметром 0.25 мм. Для детекции ионного тока использовали пару электродов Ag/AgCl в режиме фиксации напряжения. Электрод на цис-стороне от мембраны был заземлен, на *транс*-стороне – подключен к усилителю BBA-02 (Eastern Scientific LLC, США) со встроенным LP 5 kHz фильтром сигнала. Белок добавляли в концентрации 20 нг/мл для одиночных каналов и 200 нг/мл для суммарного тока с цисстороны ячейки. Измерения проводили при комнатной температуре.

Для определения потенциала нулевого тока ячейку с *транс*-стороны (с заземленным электродом) заполняли буферным раствором с 1 М КСІ, а с *цис*-стороны (электрод с положительным потенциалом) буферным раствором, содержащим 0.1 М или 1М КСІ. Электроды подключали через агаровые мостики с 3 М КСІ. В ячейку с *цис*-стороны вносили образец порина, ожидали встраивания одиночного канала и затем, регулируя величину потенциала, добивались прекращения тока через мембрану. Эксперимент проводили при рН 7.0.

Для всех приведенных экспериментальных данных были рассчитаны 95% доверительные интервалы и указано *n* — количество каналов, использованное для подсчета значений проводимости и селективности каналов, либо общее число экспериментов при определения потенциала закрытия.

Моделирование пространственной структуры. 3D-модель MpOmp построена методом гомологичного моделирования с помощью программы MOE2019.01 CCG (MOE2019.01 (Chemical Computing Group ULC, Canada)) на основании кристаллических структур поринов OmpF (из Salmonella enterica subsp, PDB 4KR8, и из Enterobacter cloacae (OmpE35) PDB 6ENE), OmpC (из Enterobacter cloacae (OmpE36 porin), PDB 5fvn) и осмопорина ОМРКЗ6 (из Klebsiella pneumoniae PDB 10SM), перекрывающих различные участки последовательности МрОтр и различающихся конформационным состоянием петель. Ремоделирование конформации наиболее вариабельных петель L3, L4 и L8, а также последующая минимизация энергии модели тримера МрОтр и симуляция молекулярной динамики в силовом поле Amber 14: EHT продолжительностью 50 нс для оптимизации полученной структуры выполнены в программе MOE2019.01 ССС. Анализ карты Рамачандрана показал, что 98.67% остатков находятся в благоприятном и допустимом состояниях, что свидетельствует о качестве полученной модели.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электрическая проводимость канала МрОтр. Запись флуктуаций тока при введении МрОтр (200 нг/мл) в буферный раствор свидетельствовала о ступенчатом увеличении проводимости мембраны. Такие дискретные флуктуации тока характерны для каналообразующих белков, однако исследуемый белок проявлял существенно меньшую (на два порядка) активность по сравнению с поринами наружной мембраны наземных грамотрицательных бактерий [8]. Обнаружено, что по сравнению с каналами поринов наземных бактерий (E. coli и Yersinia ruckeri) [9], каналы MpOmp отличались нестабильностью, повышенным уровнем шумов в записях тока, относительно коротким временем "жизни" и спонтанным переходом из открытого состояния в закрытое (рис. 1*a*). Зависимость тока от напряжения на мембране в присутствии исследуемого порина линейна в диапазоне 30-180 мВ (данные не приведены).

Для определения величины проводимости одиночного канала МрОтр были собраны более 100 показаний при потенциалах от 30 до 50 мВ. Полученное распределение величин проводимости имело три заметных максимума, для каждого из которых было рассчитано среднее значение проводимости (рис. 1 ∂ , рН 7.0). Эти данные позволяют предположить, что наиболее вероятный уровень проводимости одиночного канала порина *M. primoryensis* при рН 7.0 в 1 М КСI составляет 3.0 ± 0.2 нСм (n = 101), а кратные ему значения соответствуют олигомерным агрегатам порина.

Критический потенциал закрытия канала МрОтр. Для определения критического потенциала закрытия канала МрОтр при мембранном потенциале 50 мВ добивались встраивания некоторого количества каналов (более 10), затем потенциал уменьшали до нуля и проводили его постепенное



Рис. 1. Электрофизиологические характеристики и структурные особенности канала порина из *M. primoryensis.* a-e-3аписи тока через мембрану из DPhPC при добавлении MpOmp, инкубированного в разных условиях: a - pH 7.0, $\delta - pH 5.5$, e - pH 8.5. Концентрация белка 200 нг/мл. Мембранный потенциал 35 мВ.

е − Определение критического потенциала закрытия MpOmp: ток через мембрану в пА, потенциал на мембране в мВ. *∂* − Распределение значений проводимости канала MpOmp при различных значениях pH. Экспериментальные данные для каждого значения pH были получены минимум на 10 мембранах; количество исследованных каналов: pH 7.0 − 101 канал, pH 8.5 − 45 каналов, pH 5.5 − 32 канала.

е – Ленточная диаграмма структуры мономеров MpOmp, YrOmpF, EcOmpF и распределение заряженных AK остатков, представленных в виде поверхностей, окрашенных согласно заряду: основные – синим, кислые – красным. *ж* – Геометрические характеристики поры MpOmp, YrOmpF, EcOmpF и распределение зарядов в интерьере поры.

повышение (со скоростью 1.8 мВ/с) от 0 до 150 мВ. Точку экстремума функции тока (в которой увеличение потенциала приводит к снижению тока)

считали критическим потенциалом закрытия (рис. 1*г*). В нейтральной среде (pH 7.0) для канала MpOmp оно составило 43.8 ± 4.8 мB (n = 4).

Влияние рН среды на электрофизиологические характеристики канала МрОтр. Изменение кислотности среды может значительно изменять свойства поринового канала. Это происходит за счет электростатического поля, сформированного заряженными аминокислотами в вестибюле и внутри поры. Как известно, стенка В-цилиндра поринов сформирована преимущественно положительно заряженными аминокислотными (АК) остатками, а петля L3, погруженная в полость поры, напротив, содержит большое количество кислых остатков. На размер и селективность по отношению к зарядам проникающих ионов и гидрофильных соединений влияет также пространственная конфигурация заряженных АК остатков внутри канала [10].

При добавлении к мембране белка MpOmp, инкубированного в буферном растворе при pH 5.5 (рис. 16) и 8.5 (рис. 1в), наблюдалось ступенчатое увеличение проводимости, аналогичное эффекту, описанному для нейтральной среды.

Для оценки влияния кислотности среды на функциональную активность MpOmp были определены величины проводимости канала MpOmp и значение критического потенциала закрытия в этих условиях. Установлено, что увеличение pH среды практически не влияет на среднюю проводимость поринового канала и составляет 2.6 ± 0.3 нСм (n = 45). Напротив, в кислой области наблюдается ее достоверное уменьшение до 2.3 ± 0.1 нСм (n = 32) (рис. 1 ∂).

Оказалось, что значение критического потенциала закрытия канала также изменяется только в кислой среде. При pH 8.5 оно имеет величину 41 \pm 6 мВ (n = 4) (сравнимую с таковой в нейтральной среде), а в кислой среде наблюдается существенное увеличение этого значения до 81 \pm \pm 6 мВ (n = 4).

Селективность канала МрОтр. Экспериментальный потенциал нулевого тока сначала измеряли в симметричных условиях, а затем в условиях ионного градиента. Разность этих величин является объективной характеристикой ионной проницаемости в терминах модели Гольдмана-Ходжкина-Катца (ГКХ). Потенциал в симметричных условиях (1 М КСІ/1 М КСІ) оказался равен $0 \, \text{мB}(n=6)$, а потенциал в условиях градиента (1 M KCl/0.1 M KCl) paber 12.5 \pm 2.7 MB (n = 6). С помощью уравнения ГХК, которое связывает величину потенциала с проницаемостью мембраны и концентрацией ионов (использован калькулятор сервера https://www.physiologyweb.com/calculators/ghk equation calculator.html), была pacсчитана величина селективности канала МрОтр (Р_к/Р_{сі}), она составила 1.8. Таким образом, канал МрОтр обладает слабой катионной селективностью в отношении ионов К⁺ по сравнению с таковой поринов наземных бактерий, которые являются катион-селективными, поскольку их проницаемость для ионов калия в 3-40 раз превышает проницаемость для ионов хлора [8]. Например, P_K/P_{Cl} каналов *E. coli, Salmonella typhimurium и Pseudomonas aeruginosa* равны 3.9, 14.0 и 2.7 соответственно [8].

Структурные особенности канала МрОтр. исходя из теоретической модели порина. Анализ распределения зарядов, выполненный методом MOLE [11], выявил существенные различия между МрОтр и поринами наземных бактерий по количеству и локализации основных и кислых АК остатков в области устья и внутри канала (рис. 1е. 1ж). Несмотря на меньшее количество заряженных остатков в последовательности исследуемого порина по сравнению с поринами *E. coli* (EcOmpF) и Y. ruckeri (YrOmpF) (67 против 71 и 76 соответственно), МрОтр характеризуется аномально высоким относительным содержанием кислых остатков. Количество АК остатков, несущих положительный заряд, в молекуле МрОтр составляет 19, что значительно меньше, чем у EcOmpF и YrOmpF, имеющих в своей последовательности соответственно 30 и 32 основных остатка. Более того, анализ распределения электростатического потенциала по молекулярной поверхности 3D-модели MpOmp [12] показывает, что область поры кардинально отличается по распределению зарядов от такового у вышеупомянутых поринов (рис. 1ж). Эти области сформированы преимушественно кислыми остатками за исключением Lys21, Lys59, Arg176, Arg221, которые участвуют в стабилизации конформации петель L2, L3 и во взаимодействии между отдельными тяжами β-листа. Исключительно важными для формирования конформации петли L3 и соответственно определяющими электрофизиологические особенности канала MpOmp являются Arg176 и Arg221. Оценка энергетического вклада водородных связей и ионных взаимодействий этих остатков в стабилизацию конформации L3 с помощью соответствующего приложения программы МОЕ ССС [13] позволяет предполагать, что Arg176 "задает" направление петле L3 внутрь поры (вклад -5.57 ккал/моль). А множественные взаимодействия между вариабельными остатками последовательности MpOmp Arg221 β-кора и Asp100 петли L3 прочно связывают верхушку петли с внутренней поверхностью β-цилиндра. Их суммарный вклад в потенциальную энергию системы составил: -21.87 ккал/моль.

Выявленные особенности внутренней организации поры MpOmp могут определять необычный характер функционирования пориновых каналов морских бактерий, поскольку известно, что чувствительность каналов к напряжению на мембране в значительной степени определяется как силой электростатического взаимодействия

внутри поры [14], так и конформационной подвижностью петли L3 [15].

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ, проект № 19-04-00318.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Radjasa O.K. 2004. Deep-sea bacteria and their biotechnological potentials. J. Coast. Develop. 7 (3), 109– 118.
- Vezzi A., Campanaro S., D'Angelo M., Simonato F., Vitulo N., Lauro F. M., Cestaro A., Malacrida G., Simionati B., Cannata N., Romualdi C., Bartlett D.H., Valle G. 2005. Life at depth: *Photobacterium profundum* genome sequence and expression analysis. *Science*. **307** (5714), 1459–1461.
- Wang F., Wang J., Jian H., Zhang B., Li S., Wang F., Zeng X., Gao L., Bartlett D.H., Yu J., Hu S., Xiao X. 2008. Environmental adaptation: Genomic analysis of the piezotolerant and psychrotolerant deep-sea iron reducing bacterium *Shewanella piezotolerans* WP3. *PLoS One*. 3 (4), e1937. https://doi.org/10.1271/journal.paga.0001027
 - https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001937
- Nikaido H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 676, 593–656.
- Romanenko L.A., Uchino M., Mikhailov V.V., Zhukova N.V., Uchimura T. 2003. *Marinomonas primoryensis* sp. nov., a novel psychrophile isolated from coastal sea-ice in the Sea of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 829–832.
- Novikova O.D., Khomenko V.A., Kim N.Y., Likhatskaya G.N., Romanenko L.A., Aksenova E.I., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Portnyagina O.Y., Solov'eva T.F., Voronina O.L. 2020. Porin from marine bacterium *Ma*-

rinomonas primoryensis KMM 3633T: Isolation, physico-chemical properties, and functional activity. *Molecules*, **25** (14), 3131.

- Mueller P., Rudin D.O., Ti Tien H., Wescott W.O. 1962. Reconstitution of cell membrane structure *in vitro* and its transformation into an excitable system. *Nature*. 194, 979–980.
- Benz R., Schmid A., Hancock R.W. 1985. Ion selectivity of gram-negative bacterial porins. *J. Bacteriol.* 162, 722–727.
- 9. Чистюлин Д. К., Новикова О.Д., Зелепуга Е.А., Хоменко В.А., Лихацкая Г.Н., Портнягина О.Ю., Антоненко Ю.Н. 2019. Аномально высокий потенциал закрытия канала порина OmpF из Yersinia ruckeri: роль заряженных остатков и внутримолекулярных связей. Acta Naturae. 11 (3), 89–98.
- Cowan S.W., Schirmer T., Rummel G., Steiert M., Ghosh R., Pauptit R.A., Jansonius J.N., Rosenbusch J.P. 1992. Crystal structure explain functional properties of two *Escherichia coli* porins. *Nature*. **358** (6389), 727– 733.
- Pravda L., Sehnal D., Toušek D., Navrátilová V., Bazgier V., Berka K., Svobodová Vařeková R., Koča J., Otyepka M. 2018. MOLEonline: A web-based tool for analyzing channels, tunnels and pores (2018 update). *Nucl. Acids Res.* 46 (W1), W368–W373.
- Novikova O.D., Uversky V.N, Zelepuga E.A. 2021. Non-specific porins of Gram-negative bacteria as proteins containing intrinsically disordered regions with amyloidogenic potential. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 183, 75–99.
- Clark A.M., Labute P. 2007. 2D depiction of protein– ligand complexes. J. Chem. Inf. Model. 47, 1933–1944.
- Song W., Bajaj H., Nasrallah C., Jiang H., Winterhalter M., Colletier J.P., Xu Y. 2015. Understanding voltage gating of *Providencia stuartii* porins at atomic level. *PLoS Comput Biol.* 11(5), e1004255. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004255
- 15. Karshikoff A., Spassov V., Cowan S.W., Ladenstein R., Schirmer T. 1994. Electrostatic properties of two porin channels from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **240** (4), 372–384.

Features of the Structure and Electrophysiological Properties of a Novel Porin from the Marine Bacterium *Marinomonas primoryensis*

D. K. Chistyulin^{1, *}, E. A. Zelepuga¹, V. A. Khomenko¹, O. Yu. Portnyagina¹, O. D. Novikova¹

¹Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

*e-mail: cdk27@mail.ru

Using the lipid bilayer membrane technique, the electrophysiological properties of the channel of a novel porin from the marine bacterium *Marinomonas primoriensis* (MpOmp) have been characterized. The main characteristics were determined: the conductivity value of a single channel of MpOmp, its selectivity and the values of the critical closing potential in various media (neutral, weakly acidic, alkaline). The *in silico* approach was used to predict the geometric characteristics of MpOmp pore and the distribution of charges in the mouth and inside the porin channel.

Keywords: marine bacteria, Marinomonas primoryensis, pore-forming proteins

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 39 № 3 2022

=_____ PERSONALIA ===

ПАМЯТИ ВЛАДИМИРА АНАТОЛЬЕВИЧА ШУВАЛОВА 13.10.1943–08.01.2022

DOI: 10.31857/S0233475522030082



8 января 2022 года ушел из жизни выдающийся ученый-биофизик академик РАН Владимир Анатольевич Шувалов, лауреат Государственной премии СССР, кавалер ордена Дружбы и ордена Почета, иностранный почетный член Американской Академии искусств и наук, иностранный член Германской академии естествоиспытателей "Леопольдина", член Американского химического общества, член-корреспондент Американского общества физиологов растений.

В.А. Шувалов входил в плеяду мировых лидеров в области исследований принципов и механизмов первичного преобразования энергии

света при фотосинтезе. Обладая удивительной способностью проникать глубоко в суть самых сложных проблем, он эффективно и точно решал их с применением широкого набора физико-химических методов. Им получен ряд основополагающих результатов, составивших основу современных представлений о механизме функционирования фотохимических реакционных центров бактериального и оксигенного фотосинтеза. В.А. Шуваловым были сформулированы фундаментальные принципы и универсальность процесса разделения зарядов в реакционных центрах фотосинтеза, построена модель пространственного расположения фотоактивных бактериохлорофилловых пигментов в бактериальных реакционных центрах, подтвержденная позже методом рентгеноструктурного анализа в работах немецких авторов, удостоенных Нобелевской премии 1988 года. В последние годы научные интересы Владимира Анатольевича были в значительной степени сосредоточены на исследовании наиболее ранних, сверхбыстрых стадий фотосинтетического преобразования световой энергии методом фемтосекундной оптической спектроскопии.

Многие годы В.А. Шувалов входил в состав редакционного совета журнала "Биологические мембраны" и благодаря своим энциклопедическим знаниям и дальновидности внес ценный вклад в деятельность редсовета и развитие журнала.

Коллеги и ученики будут помнить Владимира Анатольевича, человека яркого, целеустремленного, увлеченного наукой. Светлая ему память!

Редколлегия журнала "Биологические мембраны"