СОДЕРЖАНИЕ

Том 46, номер 6, 2020

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

Особенности функционирования белка MutL из системы репарации "мисматчей" различных организмов (Обзорная статья)

М. В. Монахова, М. А. Милакина, Р. М. Трикин, Т. С. Орецкая, Е. А. Кубарева 563

Перспективные молекулярные мишени сигнальных каскадов Ras-белков для создания противоопухолевых препаратов (Обзорная статья)

С. Г. Клочков, М. Е. Неганова, Ю. Р. Александрова 580

Антибиотики из экстремофильных микромицетов (Обзорная статья)

А. А. Баранова, В. А. Алферова, В. А. Коршун, А. П. Тюрин 593

Пептид HLDF-6-амид снижает цитотоксичность доксорубицина и активирует пролиферацию инфузорий *Tetrahymena pyriformis*

О. Ю. Соколов, А. Н. Позднякова, Е. Г. Черемных, Е. В. Васильева, Н. В. Кост, Ю. А. Золотарев 666

Действие пептида LKEKK на кератиноциты человека

Е. В. Наволоцкая, В. Б. Садовников, Д. В. Зинченко, Ю. А. Золотарев, В. М. Липкин, А. Н. Мурашев 670

Разработка пилотной технологии получения рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы человека в растворимой и иммобилизованной формах

Д. А. Макаров, А. А. Зинченко, В. Н. Степаненко, Д. С. Калинин, Т. Д. Мелихова, Е. А. Нокель, М. Э. Гаспарян, И. В. Мягких, Д. А. Долгих 676

Синтез (3*R*,10*R*)- и (3*S*,10*S*)-диастереомеров 3,10-диметилспермина

М. А. Хомутов, М. Т. Хивонен, А. И. Салихов, А. О. Чижов, И. М. Рыжов, С. Н. Кочетков, Й. Вепсалайнен, Т. А. Кейнанен, А. Р. Хомутов 686

"Сдвоенные" производные пиримидина: синтез и первичная оценка гепатопротекторных свойств *in vitro*

А. Б. Выштакалюк, В. Э. Семенов, А. А. Парфенов, М. С. Шашин, Г. П. Беляев, И. В. Галяметдинова, В. В. Зобов 693

Доставка барназы к клеткам в составе липосом, функционализированных HER2-специфичным модулем DARPin

В. О. Шипунова, Е. И. Шрамова, А. А. Шульга, М. В. Шилова, С. М. Деев, Г. М. Прошкина 701

Изучение взаимодействия флуоресцентно-меченого цитохрома *c* с липосомами, митохондриями и митопластами методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии

И. Д. Гусев, А. М. Фирсов, Р. В. Черткова, Е. А. Котова, Д. А. Долгих, М. П. Кирпичников, Ю. Н. Антоненко 708

Роль материнского гена *pou5f3.3/oct60* в регуляции начальных этапов дифференцировки тканей в эмбриогенезе шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*

Е. А. Паршина, А. Г. Зарайский, Н. Ю. Мартынова 719

Влияние гипертермии на протеиназы и регуляторы роста скелетных мышц культивируемой радужной форели *O. mykiss*

Н. П. Канцерова, М. В. Чурова, Л. А. Лысенко, Е. Д. Тушина, М. А. Родин, М. Ю. Крупнова, И. В. Суховская 729

Взаимодействие наночастиц SiFe с эпителиальными и лимфоидными клетками

Н. В. Шаронова, Е. В. Свирщевская, А. А. Попов, Н. В. Карпов, Г. В. Тихоновский, А. Ю. Захаркив, С. В. Сизова, В. Ю. Тимошенко, С. М. Климентов, В. А. Олейников 736

Отрицательная корреляция между естественными антителами человека, направленными к гликотопам Galβ1-3GlcNAc и Galβ1-4GlcNAc

Н. В. Шилова, И. М. Рыжов, М. М. Зиганшина, А. С. Ракитько, М. Е. Хуфлейт, Н. В. Бовин 746

Моноклональное антитело HlyIIC-15 против С-концевого домена HlyII *B. cereus* взаимодействует с сайтом узнавания тромбином

А. В. Замятина, Н. В. Руденко, А. П. Каратовская, А. О. Шепеляковская, А. В. Сиунов, Ж. И. Андреева-Ковалевская, А. С. Нагель, В. И. Салямов, А. С. Колесников, Ф. А. Бровко, А. С. Солонин 753

Получение рекомбинантных аллергенов Phl p 1 и Amb a 1 для детекции иммуноглобулинов класса Е

О. О. Михеева, М. А. Костромина, Д. Д. Лыкошин, М. Н. Терешин, С. К. Завриев, Е. В. Свирщевская, С. В. Хлгатян, Р. С. Есипов 761

Увеличение яркости флуоресценции сверхфотостабильного мутанта EGFP путем внесения мутаций, блокирующих протонирование хромофора

А. В. Мамонтова, А. М. Шахов, А. П. Григорьев, К. А. Лукьянов, А. М. Богданов 770

Метод прогноза антигликирующей активности посредством определения энергий граничных молекулярных орбиталей на примере новых 4-гидрокси-1,4-дигидроазоло[5,1-c]-1,2,4-триазинов

Р. А. Литвинов, Р. А. Дрокин, Д. Д. Шамшина, М. Ю. Каленова, Л. Э. Усмиянова, Е. А. Муравьева, П. М. Васильев, Е. К. Воинков, Е. Н. Уломский, А. А. Спасов, В. Л. Русинов 784

Особенности межфазного каталитического гликозилирования 2-меркаптобензимидазола

Т. А. Чупахина, В. О. Курьянов 792

Письмо редактору

Производные 6,7-диалкокси-бензотиофена в качестве основы для создания флуоресцентных сенсоров на активные формы кислорода

Я. В. Болт, А. С. Царькова, Н. С. Балеева 797

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 563–579

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.151.62

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКА MutL ИЗ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ "МИСМАТЧЕЙ" РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ

© 2020 г. М. В. Монахова*, М. А. Милакина*, Р. М. Трикин, Т. С. Орецкая*,#, Е. А. Кубарева***

**ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет и НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1*

***МИРЭА – Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86*

Поступила в редакцию 24.04.2020 г.
После доработки 28.04.2020 г.
Принята к публикации 30.04.2020 г.

Во всех живых организмах существует система репарации неканонических пар нуклеотидов ("мисматчей"), получившая название MMR (mismatch repair system). Нарушение функционирования MMR на одном из этапов исправления "ошибок" в ДНК приводит к накоплению мутаций в клетках и снижает их жизнеспособность. В большинстве организмов ключевую роль в удалении "мисматчей" выполняет белок MutL, обладающий способностью вносить одноцепочечный разрыв в "дочернюю" цепь ДНК. В обзоре рассматриваются особенности репарации неканонических пар нуклеотидов в эукариотах и прокариотах, структура белка MutL, обладающего эндонуклеазной функцией, его взаимодействие с ДНК и другими белками MMR.

Ключевые слова: репарация "мисматчей", белки MutL, эндонуклеазная активность

DOI: 10.31857/S0132342320060214

ВВЕДЕНИЕ

В живых клетках некомплементарные нуклеотиды или "мисматчи" появляются в результате различных биологических процессов, например, "ошибок" при репликации ДНК, окислительных повреждений и рекомбинации неидентичных цепей [1, 2]. Система репарации "мисматчей" ДНК (MMR) важна для поддержания жизнедеятельности клетки и обнаружена в большинстве живых организмов. MMR исправляет "ошибки", допущенные ДНК-полимеразой в процессе репликации, тем самым повышая точность копирования ДНК на два–три порядка [3, 4]. Дефекты в генах белков системы репарации приводят к повышенному числу мутаций и генетической нестабильности. В клетках человека такие дефекты могут являться причиной возникновения синдрома Линча, также известного как неполипозный рак прямой кишки. Люди, страдающие синдромом Линча, имеют высокий риск развития других онкологических заболеваний [5].

Исследования на модельных организмах и клетках человека показали, что MMR выполняет множество функций в метаболизме ДНК, помимо исправления "ошибок" репликации. Известно, что белки системы MMR участвуют в связанной с транскрипцией эксцизионной репарации нуклеотидов, клеточном цикле, мейотической рекомбинации и апоптозе [6]. Несмотря на важность системы репарации "мисматчей" для организмов, а также наличие большого числа исследований, посвященных этому вопросу [7–9], до сих пор остается множество "темных пятен", касающихся механизма действия MMR. Так, на сегодняшний день не выяснено, как происходит процесс дискриминации "дочерней" цепи в ДНК. Эта проблема решена только в одном частном случае для клеток *E. coli* [10]. Таким образом, анализ публикаций, освещающих различные аспекты функционирования системы репарации "мисматчей", является актуальной задачей. Данный обзор обобщает имеющуюся информацию о предполагаемом механизме действия всех участников системы MMR, а также более де-

Сокращения: CTD – C-концевой домен белка MutL; GHKL – gyrase, Hsp90, histidine kinase и MutL, семейство АТФаз; IdeR – iron-dependent repressors, железозависимые репрессоры; MMR – репарация неканонических пар нуклеотидов ("мисматчей"); NTD – N-концевой домен белка MutL; PCNA – proliferating cell nuclear antigen, ядерный антиген пролиферирующих клеток; RER – ribonucleotide excision repair, эксцизионная репарация рибонуклеотидов; SSB – single-strand binding protein, белок, связывающий одноцепочечную ДНК; β-"зажим" – β-субъединица ДНК-полимеразы III; РСА – рентгеноструктурный анализ.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (916) 206-41-02; факс: +7 (495) 939-31-81; эл. почта: oretskaya@belozersky.msu.ru).

тально описывает строение и функции одного из ее ключевых белков – MutL.

СИСТЕМА РЕПАРАЦИИ "МИСМАТЧЕЙ" В *E. coli*

Система репарации "мисматчей" весьма консервативна и включает в себя четыре основные стадии: узнавание повреждения; распознавание "дочерней" цепи с ошибочно встроенным нуклеотидом; деградация фрагмента ДНК, содержащего "ошибку"; повторный синтез цепи ДНК и лигирование. Исторически лучше всего изучена система MMR в *E. coli* [10]. Она полностью реконструирована *in vitro* из выделенных компонентов [11]. В этой системе для узнавания "мисматчей" и инициации процесса репарации требуются три белка – MutS, MutL и MutH.

MMR "запускается" в момент узнавания неканонической пары нуклеотидов или небольших инсерционных/делеционных петель "сенсорным" белком MutS. MutS узнает почти все некомплементарные пары, которые затем исправляются системой MMR, однако сродство белка к ДНК и эффективность репарации могут зависеть от природы "мисматча" и нуклеотидной последовательности вокруг него [12].

Белки MutS входят в состав ABC-суперсемейства АТФаз. Связывание и гидролиз молекулы АТР необходимы для активации дальнейшего процесса – привлечения белка MutL [13, 14]. Несмотря на то, что бактериальные белки MutS представляют собой гомодимеры, каждая из субъединиц функционирует по-разному по аналогии с гетеродимерными белками. Методом рентгеноструктурного анализа (РСА) было показано, что только одна из субъединиц белка участвует во взаимодействии с "мисматчем" [12, 15]. Способность связывать и гидролизовать молекулу АТР также отличается для двух субъединиц [16, 17]. Благодаря такой асимметричности белок может приобретать множество конформаций, что необходимо для правильного формирования комплексов белка на ДНК и передачи сигнала для дальнейшего протекания репарации. Процессы связывания и гидролиза АТР белком MutS до сих пор уточняются, и современные представления об этих процессах описаны в работе [18]. Согласно полученным на сегодняшний день данным, одна из субъединиц MutS, находясь в поиске "мисматча", постоянно связывает и гидролизует АТР. После нахождения "мисматча" белком происходят конформационные изменения как в белке, так и в ДНК, что вызывает уменьшение сродства MutS к ADP и быстрое связывание двух молекул АТР. Затем белок претерпевает значительные конформационные перестройки и переход в так называемый "скользящий зажим". Согласно данным РСА, изменение конформации MutS приводит к формированию поверхности, необходимой для правильного взаимодействия с белком MutL. Если MutS не переходит в "скользящий зажим", комплекс MutS–MutL не образуется, и процесс репарации не реализуется [19].

Следующий ключевой участник системы репарации "мисматчей" – MutL. Бактериальные белки MutL представляют собой гомодимерные АТФазы, принадлежащие к семейству GHKL. В состав семейства входят ДНК-гиразы, белки теплового шока Hsp90, гистидинкиназы и белки MutL (gyrase, Hsp90, histidine kinase и MutL) [20]. Основная роль MutL – координация белок–белковых взаимодействий в процессах узнавания повреждения и удаления фрагмента одной из цепей ДНК, поэтому этот белок был исторически классифицирован как "молекулярный посредник" [21]. Формирование тройного комплекса между MutS, MutL и ДНК, содержащей "мисматч", достаточно для того, чтобы активировать эндонуклеазу MutH *E. coli*.

MutH – сайт-специфическая никующая эндонуклеаза, которая вносит одноцепочечный разрыв ("ник") в неметилированную цепь монометилированного участка 5'-Gm^{6}ATC-3'/3'-CTAG-5' [22]. Неметилированная (вновь синтезированная) и метилированная (на основе которой осуществлялась репликация) цепи далее будут названы "дочерней" и "материнской" соответственно. Низкая индивидуальная эндонуклеазная активность белка MutH увеличивается в 20–70 раз при взаимодействии с комплексом MutS–MutL. Внесение одноцепочечного разрыва в "дочернюю" цепь монометилированного участка 5'-Gm^{6}ATC-3'/3'-CTAG-5' обеспечивает взаимодействие с ДНК хеликазы II (UvrD) и белка, связывающего одноцепочечную ДНК (SSB – single-strand binding protein). Таким образом, главная задача MutH заключается в том, чтобы гарантировать, что репарация нацелена исключительно на вновь синтезированную цепь [5]. Такая репарация называется метилзависимой.

Репарация "мисматчей" ДНК бинаправлена, так как монометилированные участки 5'-Gm^{6}ATC-3'/3'-CTAG-5' могут находиться по обе стороны от "мисматча". Повреждения корректируются независимо от того, где во вновь синтезированную цепь белок MutH внес разрыв: в 5'- или в 3'-направлении по отношению к повреждению [23]. Если одноцепочечный разрыв локализован в 5'-направлении от "мисматча", MutH "привлекает" экзонуклеазы RecJ или ExoVII для удаления вновь синтезированной цепи. Экзонуклеазы ExoVII или ExoX участвуют в процессе репарации, если белок MutH гидролизовал ДНК в 3'-направлении от "мисматча". Затем в обоих случаях хеликаза UvrD расплетает двойную спираль ДНК по направлению к повреждению [24]. Как только цепь, содержащая ошибку, удалена, белок SSB стабилизирует одноцепочечный фрагмент так, чтобы

ДНК-полимераза III могла синтезировать правильную последовательность и ДНК-лигаза могла ликвидировать разрыв в олигонуклеотидной цепи [25].

РЕПАРАЦИЯ МИСМАТЧЕЙ В ОТСУТСТВИЕ БЕЛКА MutH

Гомологи белка MutH обнаружены только в некоторых γ-протеобактериях; в большинстве организмов эндонуклеазную функцию выполняет белок MutL. Гомологи MutL в таких организмах имеют консервативный эндонуклеазный мотив, который обеспечивает внесение одноцепочечного разрыва в "дочернюю" цепь ДНК [5] (см. далее). Бактериальные системы MMR, не содержащие MutH и, следовательно, метилнезависимые, мало изучены. Бактериальные MutL с эндонуклеазной функцией были выделены и охарактеризованы только для нескольких микроорганизмов: *Aquifex aeolicus, Bacillus subtilis, Neisseria gonorrhoeae, Thermus thermophiles, Pseudomonas aeruginosa* [26–30]. Нами был клонирован и выделен белок MutL из *Rhodobacter sphaeroides* и получены первые сведения о его свойствах [31]. У белков MutL с эндонуклеазной функцией отсутствует сайт-специфичность, и они способны гидролизовать ДНК независимо от нуклеотидной последовательности [32, 33]. Именно то обстоятельство, что бактериальные MutL являются гомодимерами, определяет необходимость четкой регуляции их действия во избежание внесения ими двуцепочечных разрывов в ДНК. Однако вопрос о том, как происходит узнавание "дочерней" цепи в большинстве бактерий, до сих пор остается нерешенным.

Следует отметить, что значительный прогресс в понимании механизма метилнезависимой репарации "мисматчей" был достигнут в случае эукариот. В эукариотах, в отличие от прокариот, гомологи MutS и MutL – гетеродимеры. Важнейшими компонентами системы MMR эукариот являются белки MutSα (гетеродимер MSH2–MSH6) и MutLα (в клетках человека: гетеродимер MLH1–PMS2; в клетках дрожжей *S. cerevisiae*: гетеродимер MLH1–PMS1) [34–36]. MutSα взаимодействует с "мисматчем" и короткими инсерционными/делеционными петлями. При возникновении в ДНК более длинных петель (2–12 пар нуклеотидов, п.н.) вместо MutSα в узнавании дефекта ДНК участвует MutSβ (гетеродимер MSH2–MSH3) [37, 38]. Белок MutLα является эндонуклеазой; после формирования комплекса MutSα–MutLα или MutSβ–MutLα он вносит одноцепочечный разрыв в "дочернюю" цепь ДНК.

В дополнение к основным белкам, в эукариотической системе MMR участвуют и многие другие белки: экзонуклеаза EXO1 [39–42]; фактор процессивности ДНК-полимеразы δ (PCNA) и репликативный фактор C (RFC), необходимый для посадки PCNA на ДНК [43–47]; репликативный белок A (RPA), связывающий одноцепочечные участки ДНК [46, 48, 49]; ДНК-полимераза δ (Pol δ) [45, 50–53]; эндонуклеаза MutLγ (гетеродимер MLH1–MLH3), функции которой до конца не ясны [54–56]; ДНК-лигаза I [50] и РНКаза H2 [57, 58]. Также было показано взаимодействие белков системы репарации "мисматчей" с поли(ADP-рибоза)полимеразой 1 (PARP1) [59] и продемонстрировано влияние белкового комплекса CAF-1 [60] и метилирования гистона H3K36 [61] на функционирование MMR.

Ключевой особенностью MMR является ее специфичность, которая гарантирует исправление "мисматча" в "дочерней" цепи, а не в "материнской". Удаление нуклеотида, находящегося в "материнской" цепи, из некомплементарной пары превращает "ошибку" репликации в мутацию. Одним из сигналов дискриминации "дочерней" цепи ДНК в эукариотах являются одноцепочечные разрывы, возникающие при репликации ДНК. Процесс репликации ДНК по своей природе является ассиметричным и протекает по разным механизмам в случае "лидирующей" и "отстающей" цепей. Синтез "лидирующей" цепи ведется непрерывно, в то время как "отстающая" цепь синтезируется короткими фрагментами (фрагменты Оказаки). Наличие разрывов между фрагментами Оказаки в "дочерней" цепи считается основным фактором дискриминации цепей при репарации "мисматчей" в "отстающей" цепи ДНК [62].

Полагают, что одноцепочечные разрывы, направляющие действие MMR, возникают в "лидирующей" цепи в ходе эксцизионной репарации рибонуклеотидов (RER – ribonucleotide excision repair). Показано, что ДНК-полимеразы ε, δ и α дрожжей встраивают один рибонуклеотид на 1250, 500 и 625 нуклеотидных остатков (н.о.) соответственно. Эти рибонуклеотиды удаляются РНКазой H2 на первой стадии процесса RER. Одноцепочечные разрывы, образующиеся при этом, находятся только в "дочерней" цепи, что может быть сигналом для направленного действия MMR [62].

PCNA и β-"зажим" как факторы активации эндонуклеазной функции белков MutL

Согласно современным воззрениям, в дискриминации "дочерней" цепи в эукариотических клетках принимает участие белок PCNA [63]. PCNA является гомотримером и по форме напоминает кольцо, которое имеет две неэквивалентные стороны: C и N (рис. 1). "Посадка" PCNA на двуцепочечную ДНК в месте образования "ника" осуществляется белком RFC таким образом, что C-сторона PCNA обращена к свободному 3'-концу ДНК, при этом PCNA приобретает форму кольца, которое скользит по ДНК [64]. Продемонстрировано, что C-сторона PCNA имеет гидро-

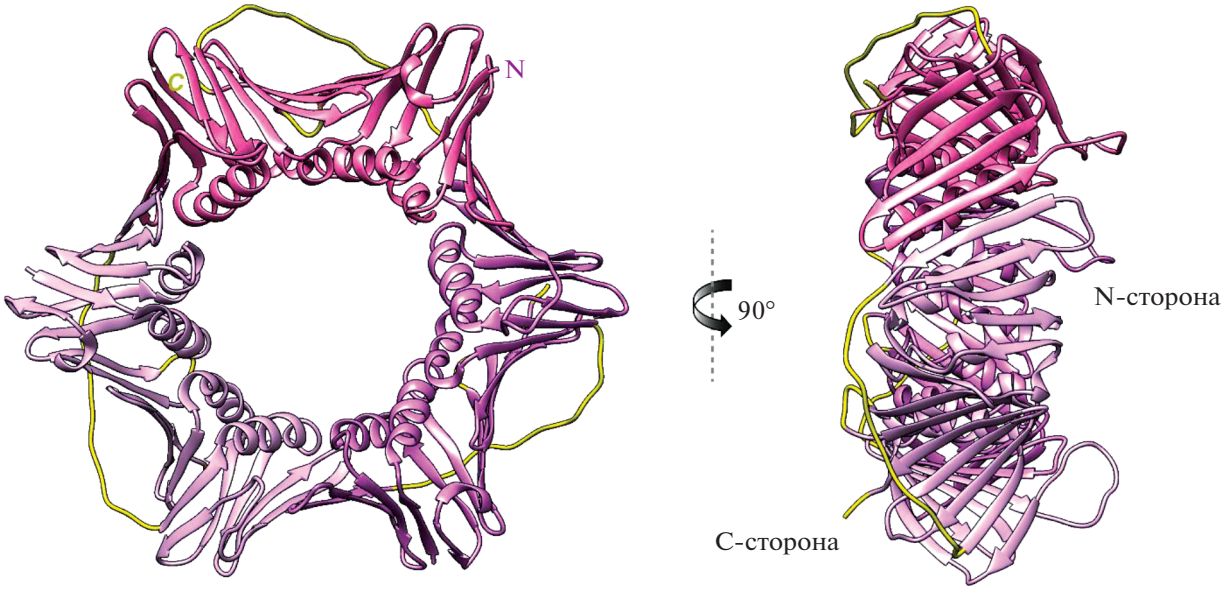


Рис. 1. Кристаллическая структура PCNA человека (PDB: 1VYM) в двух проекциях. Желтым обозначены гидрофобные участки С-стороны белка, участвующие во взаимодействии с белковыми партнерами.

фобную область, с которой контактирует большинство белков-партнеров [65]. На сегодняшний день показано взаимодействие с PCNA белков MSH(2/3/6) и обеих субъединиц MutLα человека и дрожжей [43, 66, 67]. Субъединицы MutLα содержат консервативный мотив, отвечающий за связывание с С-стороной PCNA (QXXIXP). Считается, что взаимодействие MutLα с PCNA обеспечивает ориентацию MutLα, необходимую для внесения одноцепочечного разрыва селективно в "дочернюю" цепь ДНК. Так, в недавней работе [67] продемонстрировано, что аминокислотные замены в мотиве 721-QRLIAP белка PMS2 (723-QKLIIP для дрожжевого PMS1) приводят к снижению эффективности взаимодействия PCNA с MutLα, и, как следствие, к потере способности MMR исправлять "мисматчи". Замены в PCNA-связывающем мотиве субъединицы MLH1 (562-QILIYDF) мало влияют на образование комплекса PCNA–MutLα и не "выключают" MMR, хотя и снижают эффективность процесса.

PCNA также вовлечен в активацию эндонуклеазной функции MutLα. На сегодняшний день существуют две альтернативные модели этого процесса [8]. Первая модель предполагает первоначальное образование комплекса между MutLα и находящимся около разрыва PCNA (рис. 2, слева). После формирования комплекса MutLα–PCNA MutLα распознает "дочернюю" цепь по наличию в ней одноцепочечных разрывов. Затем комплекс MutLα–PCNA скользит по ДНК и контактирует с MutSα, который активирует MutLα [68].

Другая модель предполагает, что первоначально формируется комплекс MutSα и MutLα на ДНК, содержащей "мисматч" (рис. 2, справа). Этот комплекс перемещается по ДНК. MutL в его составе взаимодействует с PCNA, что приводит к образованию тройного комплекса MutSα–MutLα–PCNA. Когда этот комплекс достигает места одноцепочечного разрыва, MutLα распознает "никованную" цепь и принимает активную конформацию. Затем комплекс MutSα–MutLα–PCNA возобновляет движение по ДНК, и MutLα гидролизует "дочернюю" цепь. Несмотря на то, что обе модели согласуются с существующими экспериментальными данными, фактические механизмы активации MutLα до сих пор не ясны.

Бактериальным аналогом PCNA является β-"зажим" (β-субъединица ДНК-полимеразы III) [69]. Структурные мотивы, обеспечивающие контакт с β-"зажимом", были найдены во многих бактериальных белках, вовлеченных в репликацию и репарацию ДНК [70]. Так, β-"зажим" стимулирует эндонуклеазную активность MutL бактерии *Bacillus subtilis* (bsMutL) [69]. В работе [27] показано, что регуляторный субдомен С-концевого домена bsMutL содержит мотив QEMIVP, взаимодействующий с β-"зажимом" (рис. 3). Аминокислотные замены в этом мотиве MutL инактивируют функционирование системы MMR *in vivo* [69, 71]. Для объяснения стимулирующего эффекта эндонуклеазной активности белков MutL при взаимодействии с β-"зажимом" была предложена модель, согласно которой скопление отрицательно заряженных аминокислотных остатков (а.о.) на поверхности С-концевого домена bsMutL препятствует связыванию фермента с ДНК. Взаимодействие bsMutL с β-"зажимом" нейтрализует эти

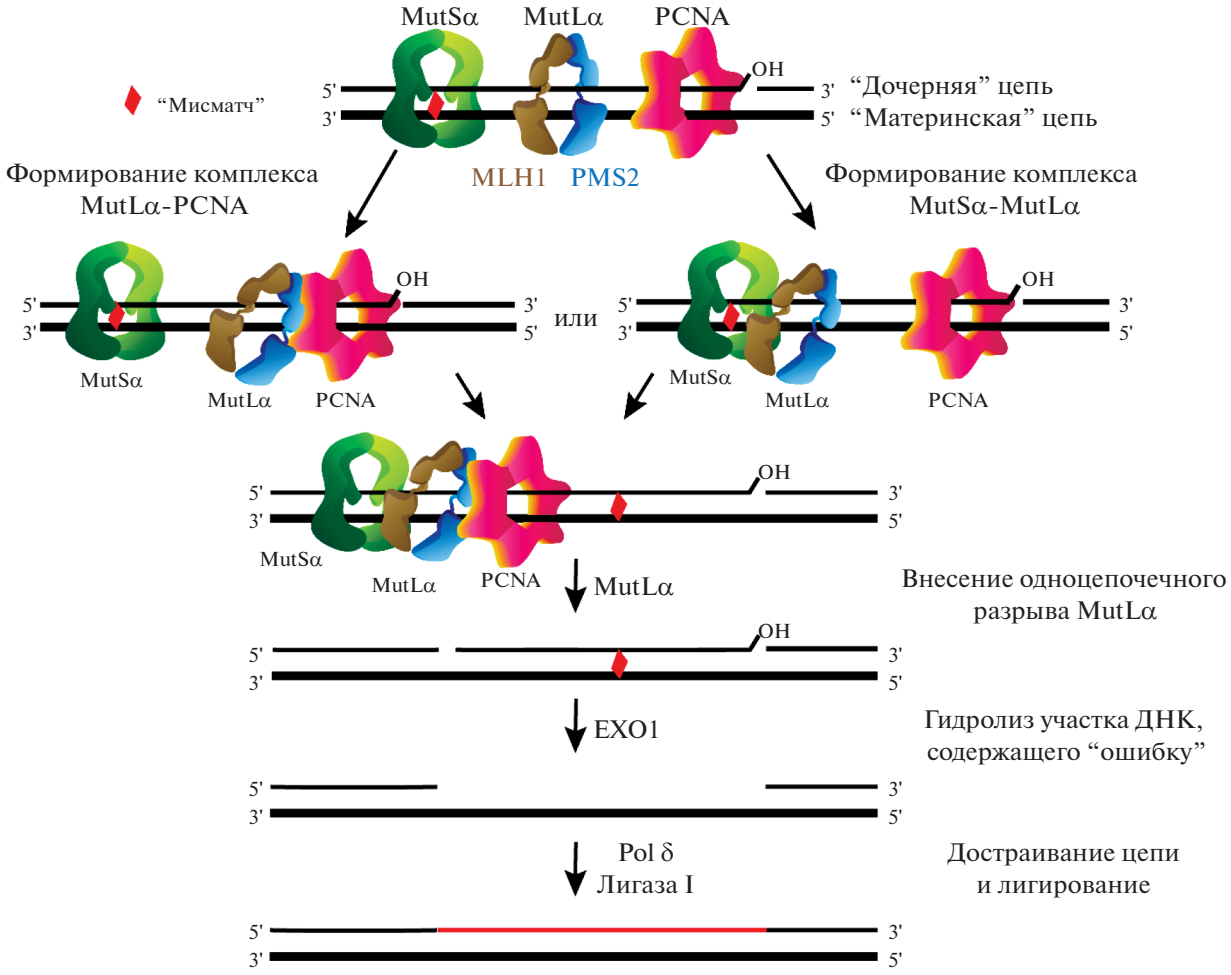


Рис. 2. Схема возможных механизмов активации MutL, внесения белком одноцепочечного разрыва в "дочернюю" цепь ДНК с 5'-стороны от некомплементарной пары и последующей EXO1-зависимой MMR в клетках человека. Предложено согласно [8].

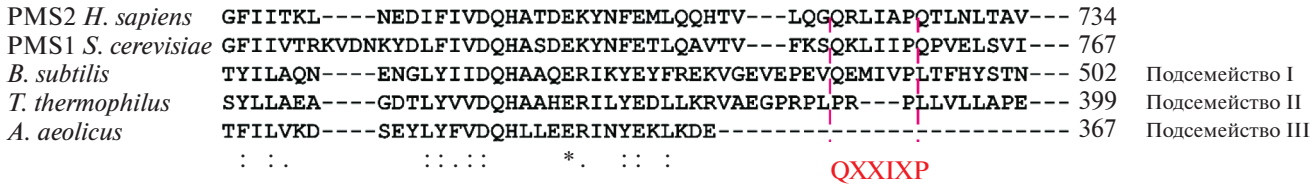


Рис. 3. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей эукариотических и бактериальных белков MutL. Розовой рамкой показан консервативный мотив MutL, участвующий во взаимодействии с PCNA или β-"зажимом". Три подсемейства бактериальных белков MutL указаны справа.

отрицательные заряды, облегчая формирование белково–нуклеинового комплекса [27]. MutL из *B. subtilis* относят к β-"зажим"-зависимым MutL, образующим подсемейство I этих белков. Несмотря на то, что бактериальные эндонуклеазы MutL являются гомодимерами, их взаимодействие с β-"зажимом" происходит аналогично взаимодействию MutLα с PCNA. Только один из двух мотивов С-концевого домена bsMutL контактирует с β-"зажимом" [72].

Кроме подсемейства I, среди бактериальных MutL выделены подсемейства II и III, которые не имеют характерного β-"зажим"-связывающего мотива и отрицательно заряженного кластера, а их эндонуклеазная активность не зависит от присутствия β-"зажима". Примерами таких белков являются MutL из *T. thermophilus* (ttMutL) – пред-

ставитель подсемейства II, у которого β-“зажим”-связывающий мотив присутствует, но не отличается консервативностью; и MutL из *A. aeolicus* (aaMutL) – представитель подсемейства III, у которого такой мотив отсутствует (рис. 3) [73].

Авторами [73] показано, что β-“зажим” не влияет на эффективность внесения одноцепочечного разрыва в ДНК белками aaMutL и ttMutL; гидролиз ДНК происходит даже в отсутствие β-“зажима”. В работе [74] была реконструирована *in vitro* система с использованием белков MutL и MutS из *T. thermophilus*. Однако ttMutL гидролизовал обе цепи ДНК-дуплекса, несмотря на наличие “ников” в одной из цепей, β-“зажима” и белка, осуществляющего “посадку” β-“зажима” на ДНК (ДНК-полимераза III, субъединицы γ, τ, δ и δ'), то есть дискриминация цепей в этом случае отсутствовала.

Таким образом, β-“зажим” по-разному влияет на эндонуклеазную активность бактериальных белков MutL. Это свидетельствует не только о различиях в механизме дискриминации цепей системами MMR бактерий и эукариот, но и о различиях среди самих бактериальных систем MMR, содержащих MutL с эндонуклеазной функцией.

EXO1-зависимая и EXO1-независимая MMR в клетках человека

Основным механизмом MMR у эукариот считается EXO1-зависимая репарация. Белок EXO1 является 5'-3'-экзонуклеазой, поэтому наличие “ника” с 5'-стороны от “мисматча” используется EXO1 в качестве отправной точки для 5'-3'-направленного удаления фрагмента “дочерней” цепи, содержащей “ошибку” (рис. 2). Однако, как и в клетках *E. coli*, в эукариотах MMR бинаправлена, но в данном случае ход процесса определяется тем, с какой стороны от “мисматча” (5' или 3') локализованы одноцепочечные разрывы. Если “ник” находится с 3'-конца от “мисматча”, то активированная эндонуклеаза MutLα гидролизует такую ДНК, внося разрывы с 5'-стороны от “мисматча”, таким образом обеспечивая EXO1-зависимую репарацию [75]. В этом случае белок RFC, помимо посадки PCNA на ДНК, регулирует активность EXO1, тем самым защищая ДНК от нежелательной деградации [46]. Наличие “ника” с 5'-конца от “мисматча” достаточно для инициации MMR, и внесение дополнительного разрыва в ДНК белком MutLα не требуется. В этом случае EXO1 может непосредственно контактировать с MutSα, что стимулирует экзонуклеазную функцию фермента [8].

В отсутствие EXO1 система MMR может обойтись без стадии удаления фрагмента ДНК (EXO1-независимый механизм) [53]. Для реализации этого механизма необходимы белки MutSα, MutLα, PCNA, RFC и Pol δ, а также наличие “ника” в “дочерней” цепи. В этом случае MutLα гидролизует “дочернюю” цепь ДНК, внося одноцепочечный разрыв с 5'-стороны от “мисматча”. Pol δ синтезирует новый фрагмент ДНК, используя в качестве стартовой позиции образующийся в месте разрыва 3'-конец. За счет синтеза новой цепи холоферментом Pol δ происходит вытеснение цепи, содержащей “ошибку”. В ходе процесса происходит активация белка RPA, который связывает одноцепочечную ДНК, препятствуя образованию ДНК-дуплекса. Показано, что скорость EXO1-независимой MMR значительно ниже, чем скорость репарации с участием EXO1, поэтому в клетках, вероятнее всего, процесс репарации “мисматчей” проходит по EXO1-зависимому механизму [53].

СТРУКТУРА БЕЛКА MutL И ЕГО ФУНКЦИИ

Кроме MMR, белки MutL участвуют в других клеточных процессах [8, 76, 77]. Наряду с MutLα, в эукариотах присутствуют другие гетеродимеры – MutLβ (MLH1–PMS1) и MutLγ (MLH1–MLH3) – роль которых в клетке до конца не выяснена. Субъединица MLH3 в MutLγ обладает эндонуклеазной активностью. Несмотря на то, что MutLγ может частично заменять MutLα в процессе репарации “мисматчей”, показано, что основной его функцией является участие в поздней стадии мейотической рекомбинации, которая заключается в “процессировании” соединенных между собой молекул (таких как структуры Холлидея) в кроссоверные ДНК [78, 79]. Третий гетеродимер, MutLβ, не обладает эндонуклеазной активностью, однако он также играет роль в мейотической рекомбинации. MutLβ взаимодействует с мейотической хеликазой Mer3, привлекая ее к местам рекомбинации независимо от распознавания “мисматчей” [80]. Недавние исследования показали участие MutLβ и MutLγ в экспансии тринуклеотидных повторов [81–87]. Также было продемонстрировано, что эндонуклеазная функция MutLγ активируется только в присутствии MutSβ и инициирует собственный механизм удаления повреждения [88].

Несмотря на различные роли, которые выполняют белки MutL из разных организмов, все гомологи этих белков имеют два домена – N-концевой и C-концевой, соединенные вариабельным линкером (рис. 4). Первичная структура N-концевого домена MutL является высоко консервативной, в то время как первичная структура C-концевого домена MutL может быть вариабельной. Однако локализация и укладка в пространстве основных элементов вторичной структуры являются строго определенными [89]. N-Концевая область белка содержит АТФазный домен. Также в N-концевой области находится ДНК-связывающий центр MutL. C-Концевая область MutL содержит субдомен, участвующий в диме-

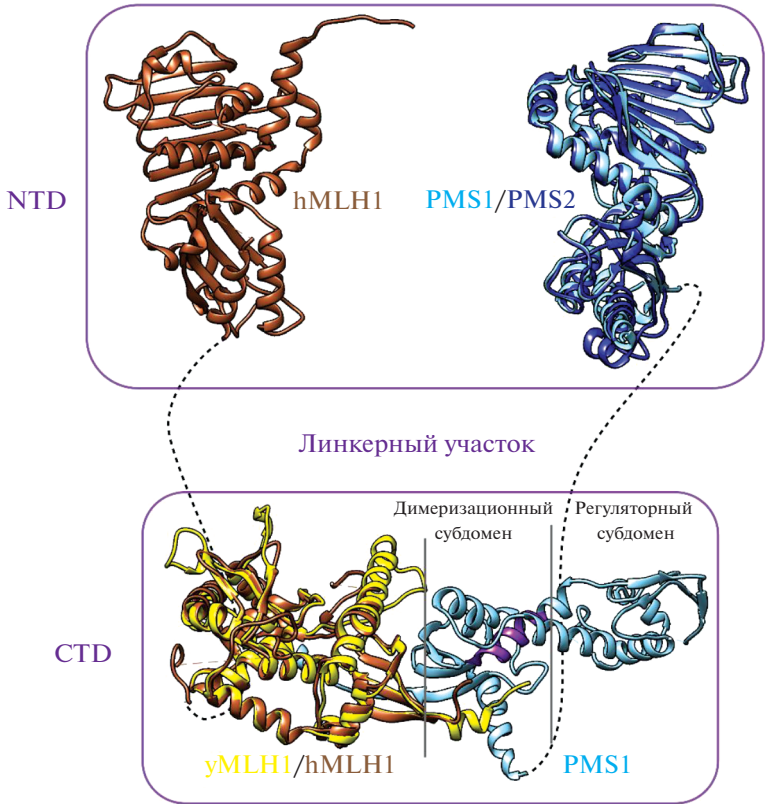


Рис. 4. Совмещение кристаллических структур белков MutLα дрожжей (PDB: 4E4W и 3H41) и человека (PDB: 3RBN, 3NA3 и 1H7S). Субъединицы MLH1 дрожжей (yMLH1) и человека (hMLH1) обозначены желтым и коричневым цветами соответственно; субъединицы PMS1 и PMS2 – голубым и синим соответственно. Рамками выделены N- и C-концевые домены белков (NTD и CTD). Фиолетовым цветом обозначен эндонуклеазный мотив $DQHA(X)_2E(X)_4E$. Пунктиром обозначены линкерные участки. Предложено согласно [119].

ризации, а также внешний субдомен, обращенный к растворителю, который также называют регуляторным. Между димеризационным и внешним субдоменами расположен металлсвязывающий мотив, играющий важную роль в гидролизе ДНК (эндонуклеазный субдомен).

Описанная выше архитектура белков MutL необходима и достаточна для их функционирования. Она предполагает существенные конформационные перестройки белковой молекулы, которые происходят под действием различных факторов и требуются для протекания процесса MMR.

АТФазная функция MutL

Получены кристаллические структуры N-концевых доменов MutL из *E. coli* и *A. aeolicus*, а также белков MLH1, PMS2 и PMS1 человека и дрожжей [90–94]. Эти домены состоят из двух субдоменов. Первый субдомен имеет в своем составе 5 консервативных мотивов (VVKELVENALDAGA, DNGXGM, TLGFRGEALXS, GT и NGR), отвечающих за связывание и гидролиз молекулы АТР [31, 95]. Нарушение АТФазной функции белка может приводить к нарушениям в работе системы MMR. Так, а.о. N38 и D63 (MLH1 человека) и N45 и D70 (PMS2) из мотивов VVKELVE**N**ALDAGA, **D**NGXGM необходимы для связывания АТР. Аминокислотами, играющими ключевую роль в гидролизе АТР, являются E34 (MLH1 человека) и E31 (PMS2) из мотива VVK**E**LVENALDAGA [91]. Введение замен N38A, D63N в MLH1, а также N45A, D70N в PMS2 приводит к инактивации системы MMR [96]. При этом мутантные формы с единичной заменой MLH1(E34A) и PMS2(E41A) не препятствуют протеканию MMR. Двойная замена MLH1(E34A) и PMS2(E41A) в гетеродимере MLH1–PMS2 приводит к полному “выключению” репарации “мисматчей”, блокируя способность MutLα вносить разрыв в ДНК в присутствии MutSα, PCNA, RFC, АТР, Mg^{2+} [96].

Второй субдомен N-концевого домена MutL, предположительно, отвечает за ДНК-связывающую активность белка [93]. При сравнении полученных кристаллических структур для белков MLH1, PMS2 и PMS1 обнаружено схожее взаимное расположение двух субдоменов [5]. Стоит отметить, что паралоги PMS обладают заметно меньшим сродством к АТР по сравнению с белка-

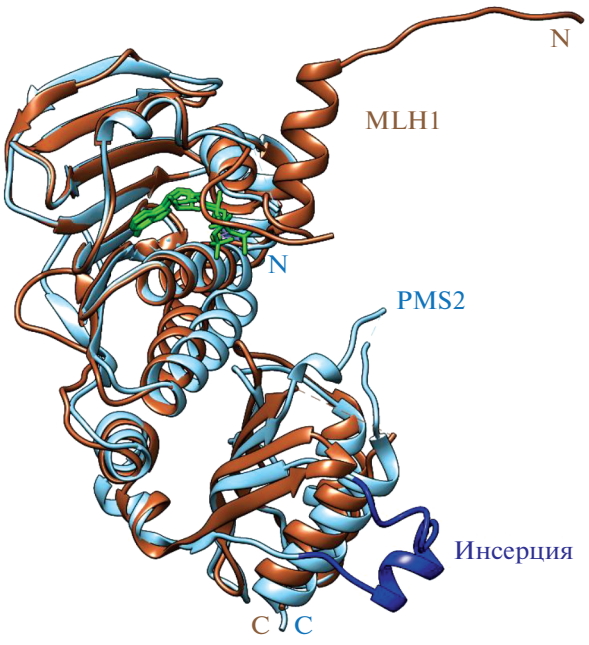


Рис. 5. Совмещение кристаллических структур АТФазных доменов белков MLH1 и PMS2 в комплексе с ATP и ATPγS соответственно (PDB: 3NA3, 1H7U). Синим цветом обозначена инсерция пептида в белке PMS2, зеленым – нуклеотидные кофакторы ATP и ATPγS.

ми MLH [5]. Такое различие, возможно, объясняется особенностями структуры АТФазного домена: белок PMS2 человека (и его гомолог PMS1 в дрожжах) имеет уникальные инсерции, которые находятся во втором субдомене (рис. 5, обозначены синим цветом). Инсерции могут влиять на взаимное расположение субдоменов и, как результат, оказывать воздействие на способность белка связывать ATP.

Большинство членов семейства GHKL формируют димеры, которые претерпевают значительные конформационные изменения при связывании или гидролизе ATP [97] (рис. 6). В апо-состоянии С-концевые домены находятся в димерной форме, в то время как N-концевые домены остаются в виде мономеров (“открытая” форма). Связывание ATP приводит к димеризации двух АТФазных доменов и образованию более компактной “закрытой” формы. Последующий гидролиз ATP и диссоциация ADP из комплекса с белком возвращают NTD в мономерное состояние. Интересно, что для эукариотических клеток методом атомно-силовой микроскопии зафиксированы ассиметричные конформационные изменения, связанные с различным сродством двух субъединиц MutLα к ATP [98]. Цикл конформационных перестроек MutL сравнивают с аналогичным циклом для другого белка семейства GHKL, Hsp90, N-концевые домены которого тоже димеризуются при связывании ATP [99]. Конформационные изменения и стабилизация N-концевого домена Hsp90 в результате связывания нуклеотидов позволяют ему взаимодействовать с другими белками. Похожая модель функционирования предложена и для белка MutL, формирующего комплексы с MutS и другими белками MMR [100]. Конформационные изменения при связывании и гидролизе молекулы ATP белками MutL обусловливают регуляцию эндонуклеазной функции их С-концевого домена [28]. Эндонуклеазная активность MutLα человека и дрожжей стимулируется присутствием ATP [75]. С другой стороны, по данным литературы нельзя сделать однозначный вывод о влиянии ATP на эффективность гидролиза ДНК белками MutL из различных бактерий. Способность белков MutL из *T. thermophilus* и *N. gonorrhoeae* (ttMutL и ngMutL) вносить одноцепочечный разрыв в ДНК ингибируется добавлением ATP в реакционную смесь [28, 30]. Показано, что эндонуклеазная функция aaMutL может и активироваться [101], и ингибироваться [30] в зависимости от концентрации ATP и ионов Mn^{2+}. Низкие концентрации ATP стимулируют гидролиз ДНК белком bsMutL, а высокие – ингибируют [27]. В работе [31] показано, что присутствие ATP в реакционной смеси снижает степень расщепления суперскрученной ДНК белком MutL из *R. sphaeroides* (rsMutL). Таким образом, различия во влиянии ATP на эндонуклеазную активность белков MutL из различных организмов могут говорить об отличающихся механизмах активации белка, которые еще предстоит установить.

СВЯЗЫВАНИЕ MutL С ДНК

Кристаллическую структуру комплекса полноразмерного MutL с ДНК получить не удается из-за высокой конформационной подвижности белка. Известно, что белки MutL взаимодействуют с ДНК с низкой эффективностью. ДНК-связывающий центр MutL локализован в N-концевом домене белка [102]. Полагают, что ДНК связывается в участке MutL, который богат положительно заряженными аминокислотными остатками и сформирован АТФазным субдоменом и α/β-субдоменом N-концевого домена (рис. 7). Так, в дрожжевых гомологах MutL замены аминокислот Arg273 и Arg274 (в MLH1) в α/β-субдомене или Lys197 и Arg198 (в PMS1) в АТФазном субдомене снижают эффективность комплексообразования MutL с ДНК и приводят к понижению способности системы MMR исправлять “мисматчи” [94, 103, 104]. Двойная замена R273E/R274E в дрожжевом белке MLH1 блокирует MMR [1]. В работе [90] был обнаружен положительно заряженный участок в N-концевом домене MutL из *Aquifex aeolicus*, и было продемонстрировано, что а.о. Arg156, Lys158, Arg259 и Lys265 являются необходимыми для связывания белком ДНК. В слу-

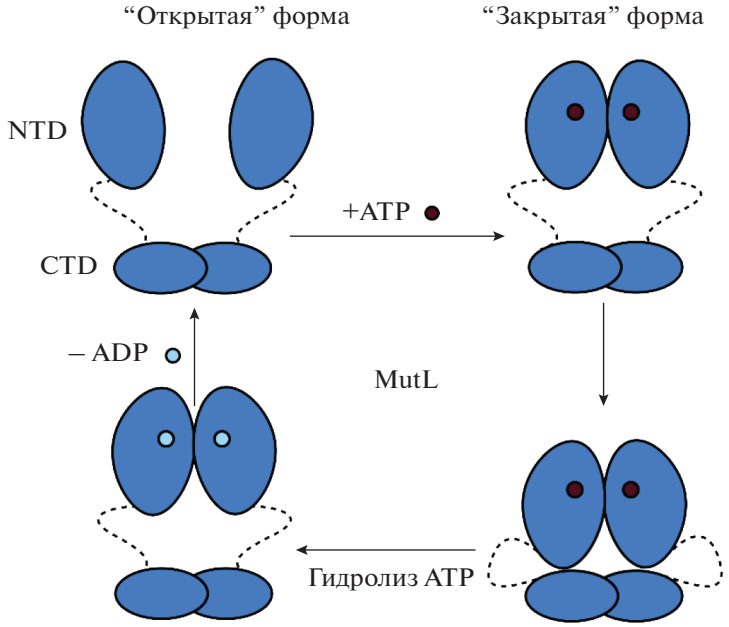


Рис. 6. Схематическое изображение конформационных перестроек MutL, вызванных связыванием и гидролизом ATP. Бордовые и голубые точки обозначают ATP и ADP соответственно. N- и C-концевые домены обозначены как NTD и CTD соответственно.

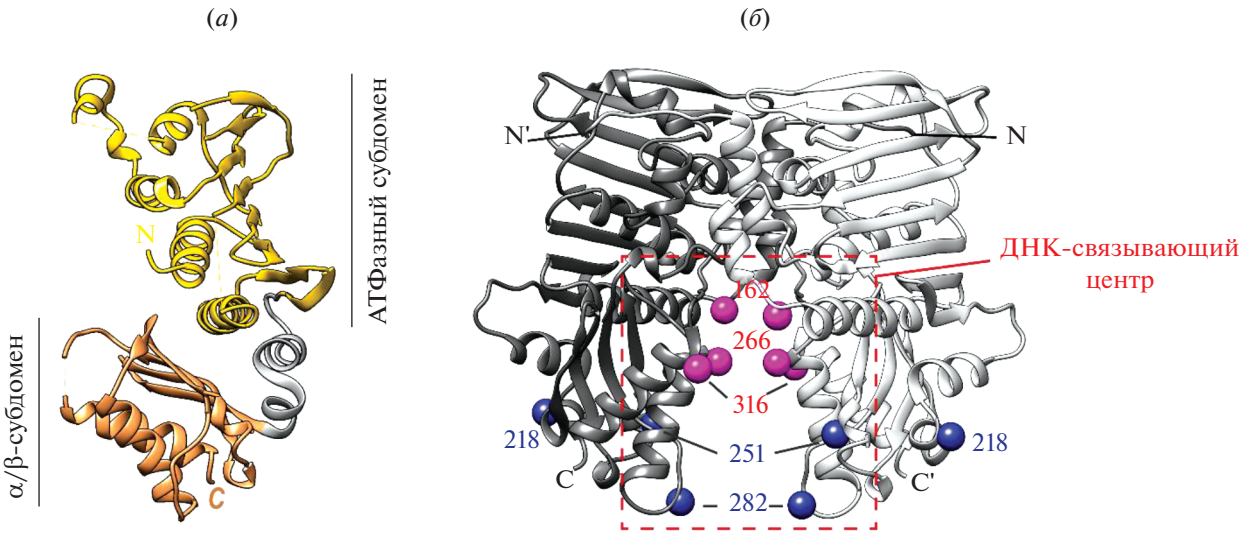


Рис. 7. Строение N-концевого домена MutL из *E. coli*. (*а*) Кристаллическая структура мономера MutL-NTD (PDB: 1BKN). Желтым цветом отмечен АТФазный субдомен, коричневым – α/β-субдомен. (*б*) Кристаллическая структура димера MutL-NTD в комплексе с AMP-PNP (PDB: 1B63). Розовыми сферами обозначены остатки Arg, необходимые для связывания ДНК согласно [19], синими – остатки, сближенные с ДНК в процессе функционирования белка согласно [107]. Красной пунктирной рамкой указана предполагаемая ДНК-связывающая область MutL.

чае белка MutL из *E. coli* также показано, что замена Arg162, Arg266 и Arg316, находящихся в АТФазном и α/β-субдоменах, на Glu приводит к полной потере способности белка образовывать комплексы с ДНК [19, 93, 105, 106]. Недавно нами с помощью комбинации методов “кросслинкинга” и FRET было продемонстрировано, что положения 218, 251 и 282 в MutL из *E. coli* являются сближенными с ДНК в процессе функционирования белка [107].

Показано, что N-концевой домен гомологов белка MutL из *E. coli*, человека и дрожжей спосо-

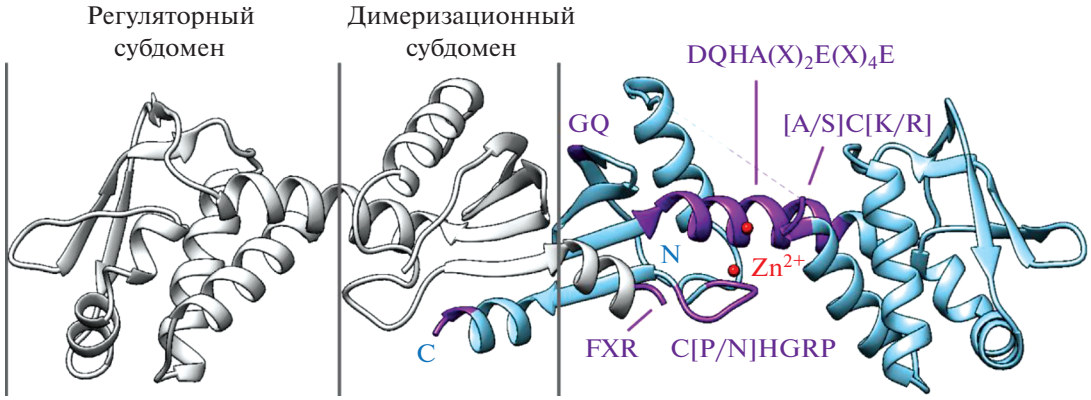


Рис. 8. Кристаллическая структура С-концевого домена bsMutL (PDB: 3KDK). Консервативные мотивы эндонуклеазного центра белка указаны фиолетовым цветом. Ионы цинка обозначены красными сферами. Предложено согласно [27].

бен связывать ДНК самостоятельно. Однако наличие С-концевого домена увеличивает сродство N-концевого домена к ДНК [93, 94].

Белок MutL и его гомологи связывают как одноцепочечную, так и двуцепочечную ДНК независимо от ее нуклеотидной последовательности [38] и наличия в ней "мисматча" [32, 33]. Эффективность комплексообразования MutL с ДНК зависит от многих факторов: ионной силы раствора, длины ДНК и наличия кофакторов (ADP, ATP, негидролизуемых аналогов ATP). Показано, что наиболее стабильные комплексы с ДНК белки MutL формируют при низкой ионной силе раствора [108]. Эффективность образования комплексов с ДНК растет по мере увеличения длины последней. Так, при первом исследовании ДНК-связывающей активности белка MutL из *E. coli* было обнаружено, что эффективнее всего белок образует комплексы с ДНК длиной более 100 п.н. [32]. С развитием методов детекции было зафиксировано связывание MutL из *E. coli* с 41-звенной ДНК [19]. Кроме того, недавно были впервые получены ковалентно связанные комплексы белка с 17-звенной ДНК [109]. В случае белка MutL из *A. aeolicus*, который содержит удивительно короткий линкерный участок (5 а.о.), авторами работы [71] была предложена модель взаимодействия MutL с ДНК, а также было показано, что "место посадки" такого белка на ДНК составляет 30 п.н.

ДНК-связывающая функция гомологов MutL влияет на их АТФазную активность, как и в случае белков MutS [14, 110]. Например, наличие одноцепочечной и двуцепочечной ДНК в реакционной смеси может значительно повышать АТФазную активность MutL [93]. В то же время эффективность комплексообразования MutL с ДНК практически не изменяется при связывании белком ATP. Показано, что ATP не требуется для образования комплекса MutL с ДНК, но необходим для формирования комплекса MutS–MutL [19]. В недавней работе убедительно продемонстрировано на системе из *E. coli*, что основная функция связывания ATP белком MutL – это образование "скользящего зажима" на ДНК [7]. Образующийся стабильный долгоживущий комплекс MutS–MutL "скользит" по ДНК в поисках места гидролиза белком MutH. Кроме того, авторы предполагают, что "скользящий" по ДНК комплекс включает в себя не только белки MutS и MutL, но и MutH. Таким образом, связывание и гидролиз ATP необходимы белку MutL для активации дальнейших стадий репарации.

Эндонуклеазная функция белка MutL

Кристаллографический анализ С-концевых доменов (CTD) бактериальных и эукариотических гомологов MutL показал, что каждый домен состоит из регуляторного и димеризационного субдоменов [8, 27, 111]. Сравнение аминокислотных последовательностей белков MutL выявило наличие 5 консервативных мотивов ($DQHA(X)_2E(X)_4E$, [A/S]C[K/R], CPHGRP, FXR и GQ), образующих каталитический центр (рис. 8) [95]. Примечательно, что в работе [31] с помощью биоинформатического анализа была выявлена группа бактериальных белков MutL, у которых присутствует только мотив $DQHA(X)_2E(X)_4E$ и отсутствуют все остальные эндонуклеазные мотивы. Например, к этой группе относятся белки MutL из организмов, принадлежащих классам *Chlamydiales* и *Bacteroidia*. Авторы предполагают, что белки MutL с одним консервативным эндонуклеазным мотивом способны гидролизовать ДНК, однако эта гипотеза требует экспериментальной проверки.

Моделирование структуры С-концевого домена MutL из *B. subtilis* (bsMutL-CTD) с ДНК показало, что мотив $DQHA(X)_2E(X)_4E$ и фосфодиэфирная связь в ДНК находятся на расстоянии,

которое позволяет карбоксильной группе остатка Asp в первой позиции этого мотива катализировать гидролиз ДНК [27]. Замена Asp в этом мотиве на Asn в MutL из *B. subtilis* и *T. thermophilus* инактивирует их эндонуклеазную функцию и, соответственно, препятствует протеканию MMR [27, 30]. В работе [28] получено несколько мутантных форм, содержащих замены аминокислотных остатков в $DQHA(X)_2E(X)_4E$-мотиве MutL из *N. gonorrhoeae* (ngMutL). Мутантные формы с одной заменой D491N и E497Q оказались активными на 70% по сравнению с "диким типом"; белок ngMutL с двойной заменой D491N/E497Q в С-концевом домене сохранял эндонуклеазную активность лишь на 15%, что может дополнительно свидетельствовать о важности остатков Asp и Glu для осуществления белком гидролитической функции.

В случае эукариотических гомологов MutL замены в консервативных мотивах, формирующих эндонуклеазный центр белка, также приводят к нарушению функции катализа гидролиза ДНК. Так, замены D699N и E705K в мотиве 699-$DQHA(X)_2E(X)_4E$-710 в субъединице PMS2 белка MutLα человека приводят к полной потере эндонуклеазной активности [53, 75]. Подобная замена в дрожжевом белке PMS1(E707K) не только нарушает способность MutLα гидролизовать ДНК, но и подавляет связанную с MMR гомологическую рекомбинацию [112]. Также при исследовании мотива $DQHA(X)_2E(X)_4E$ субъединицы PMS2 MutLα человека было показано, что аминокислотный остаток H701 является необходимым для функционирования MutLα, а консервативный остаток E710 – нет [113]. Это может свидетельствовать об участии этой аминокислоты в другой, еще невыясненной, функции MutLα. В целом, исследования гидролитической активности эукариотических белков MutLα показывают, что эндонуклеазная функция необходима не только для реализации процесса MMR, но и для протекания гомологической рекомбинации и апоптоза [114].

Влияние ионов двухвалентных металлов на гидролиз ДНК белком MutL

Несмотря на то, что и бактериальные, и эукариотические белки MutL содержат консервативные мотивы в С-концевом домене, катализ гидролиза ДНК этими белками имеет ряд индивидуальных особенностей, связанных с влиянием ионов двухвалентных металлов на этот процесс. Показано, что MutLα человека и дрожжей проявляют эндонуклеазную функцию только в присутствии ионов Mn^{2+} [75, 112], в то время как их бактериальные аналоги активны в присутствии ионов разных двухвалентных металлов. Например, MutL из *T. thermophilus* (ttMutL) и из *A. aeolicus* (aaMutL) гидролизуют суперскрученную плазмиду в присутствии ионов Mn^{2+}, Ni^{2+} или Co^{2+}, но не в присутствии ионов Mg^{2+}, Zn^{2+} или Ca^{2+} [29, 30]. В работе [28] показано, что ngMutL и его С-концевой домен способны вносить разрыв в плазмидную ДНК в присутствии ионов Mn^{2+} или Mg^{2+}, но не в присутствии ионов Ca^{2+}. Белок bsMutL проявляет гидролитическую активность только в присутствии ионов Mn^{2+}. В нашей работе [31] установлено, что ионы Mn^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+} и Cd^{2+} стимулируют гидролиз плазмидной ДНК белком rsMutL, а присутствие ионов Ni^{2+}, Ca^{2+} и Zn^{2+} не влияет на эндонуклеазную функцию белка. Интересно, что добавление в реакционную смесь, содержащую bsMutL и ионы Mn^{2+}, второго иона металла (Ca^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}) увеличивает количество "никованной", а также линейной формы ДНК по сравнению с действием только Mn^{2+} в тех же условиях [27]. Влияние ионов двухвалентных металлов на эндонуклеазную функцию бактериальных MutL суммировано нами ранее в работе [31].

Важное место среди ионов двухвалентных металлов занимают ионы Zn^{2+}. При анализе кристаллической структуры С-концевого домена bsMutL, как и в случае MutLα дрожжей, показано, что мотивы $DQHA(X)_2E(X)_4E$ и [A/S]C[K/R] координируют два иона Zn^{2+} (рис. 9). Основная разница в структурах bsMutL и MutLα дрожжей заключается в характере связывания ионов Zn^{2+}. В случае bsMutL-CTD только один ион Zn^{2+} (номер ***1***) полностью координирован а.о. Glu468, Cys604, His606 и молекулой воды (рис. 9*а*), в то время как в координационную сферу второго иона Zn^{2+} (номер ***2***) только частично включены функциональные группы а.о. His464, Glu468, Cys573 [27]. Замены консервативных аминокислотных остатков, входящих в каталитический и предполагаемый Zn^{2+}-связывающий центры, нарушают действие MutL *in vitro* [112].

В отличие от bsMutL-CTD, в MutLα дрожжей задействован четвертый консервативный мотив – FXR, который имеет строгую консенсусную последовательность (FERC). В структуре дрожжевого белка MutLα мотив FERC находится в непосредственно близости от каталитического центра PMS1 и координирует два иона Zn^{2+} (рис. 9*б*) [111]. В бактериальном MutL этот мотив не имеет консервативного остатка Cys, контактирующего с Zn^{2+} [113]. Таким образом, в структуре MutLα-CTD оба иона Zn^{2+} полностью координированы а.о. из четырех консервативных эндонуклеазных мотивов.

Подобная разница в сродстве MutL из разных организмов к ионам Zn^{2+} может свидетельствовать о том, что ионы металла выполняют в этих белках разную роль. Так, схожий с MutLα механизм хелатирования наблюдается у нескольких

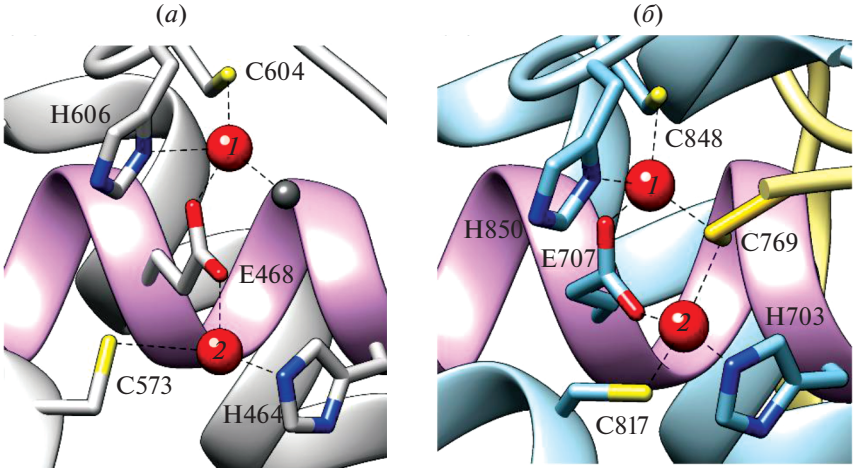


Рис. 9. Структура эндонуклеазных доменов (*а*) bsMutL (PDB: 3KDK) и (*б*) MutLα дрожжей (PDB: 4E4W). Красными сферами обозначены ионы цинка; розовым цветом показан мотив $DQHA(X)_2E(X)_4E$. Предложено согласно [89].

нуклеаз, где а.о. из четырех мотивов также координируют два иона металла [115]. Предполагают, что ионы Me^{2+} входят в каталитический центр белка [111]. В случае bsMutL из-за меньшего сродства белка к ионам Zn^{2+} считается, что Zn^{2+}-связывающий центр имеет скорее структурную, а не каталитическую роль [27].

В работе [27] bsMutL-CTD был закристаллизован в трех различных формах – в условиях, соответствующих увеличению концентрации Zn^{2+} в среде. Структурный анализ этих форм показал существенное сближение друг с другом а.о., ответственных за гидролиз ДНК, благодаря комплексообразованию с Zn^{2+}. Связывание MutL с ионами двухвалентных металлов также обеспечивает устойчивую взаимную ориентацию димеризационных и регуляторных субдоменов гомодимера белка, которые в отсутствие ионов металлов более подвижны.

В пользу предположения о структурной, а не каталитической роли ионов Zn^{2+} свидетельствует и отмеченное в работе [27] сходство первичной и вторичной структур MutL-CTD и белков семейства IdeR (iron-dependent repressors), а также конформационные изменения, вызванные связыванием ионов металлов. Так, IdeR из *Mycobacterium tuberculosis* имеет два металлсвязывающих центра, один из которых является функциональным и имеет высокое сродство к Fe^{2+}, а второй – структурный – обладает сродством к Zn^{2+}. В работе [116] показано, что при одновременном присутствии ионов Fe^{2+} и Zn^{2+} степень связывания ДНК белком IdeR значительно выше, чем в присутствии только ионов Fe^{2+} в той же концентрации. Таким образом, предполагается, что связывание ионов Zn^{2+} способствует предварительной организации IdeR, приводящей к конформационному переходу в структуру, обеспечивающую более эффективное связывание Fe^{2+}.

В противоположность данным, полученным для bsMutL, в кристаллической структуре ngMutL-CTD не наблюдались значительные конформационные перестройки при анализе его в присутствии ионов Zn^{2+}, что может свидетельствовать, формировании структуры эндонуклеазного центра без участия этого иона [117].

В работе [118] была решена кристаллическая структура aaMutL-CTD (PDB: 5Z42). В ней визуализировались три иона цинка, расположенные около спиралей α1 и α2 и петли L2, которые включают мотивы $DQHAX_2EX_4E$, ACR и CPHGRP (рис. 10*а*). Ион Zn^{2+} в позиции ***1*** координируется а.о. Glu357, Cys402 и His404; в позиции ***2*** – His353, Glu357 и Cys371 (рис. 10*б*). Ион Zn^{2+} в позиции ***3*** координируется Cys371 спирали α2. Ионы Zn^{2+} в позициях ***1*** и ***2*** в структуре aaMutL-CTD занимают схожую позицию с их локализацией в структуре bsMutL-CTD.

В работе [118] также была предпринята попытка получить кристаллическую структуру aaMutL-CTD в отсутствие ионов металла. Однако этого сделать не удалось; в результате структурного анализа в aaMutL-CTD было обнаружено присутствие одного иона Zn^{2+} в позиции ***1*** (PDB: 5Z41). Этот единственный ион Zn^{2+} координируется а.о. Glu357, Cys371, Cys402 и His404. Отметим, что взаимодействие иона Zn^{2+} с Cys371 отсутствовало в структуре с тремя ионами металла. При совмещении структур с одним и тремя ионами цинка (PDB: 5Z41 и 5Z42) была замечена значительная разница в организации некоторых участков полипептидной цепи (рис. 10*в*). Так, а.о. 367–374 в присутствии трех ионов Zn^{2+} формируют спираль α2, в то время как в присутствии одного иона Zn^{2+} в

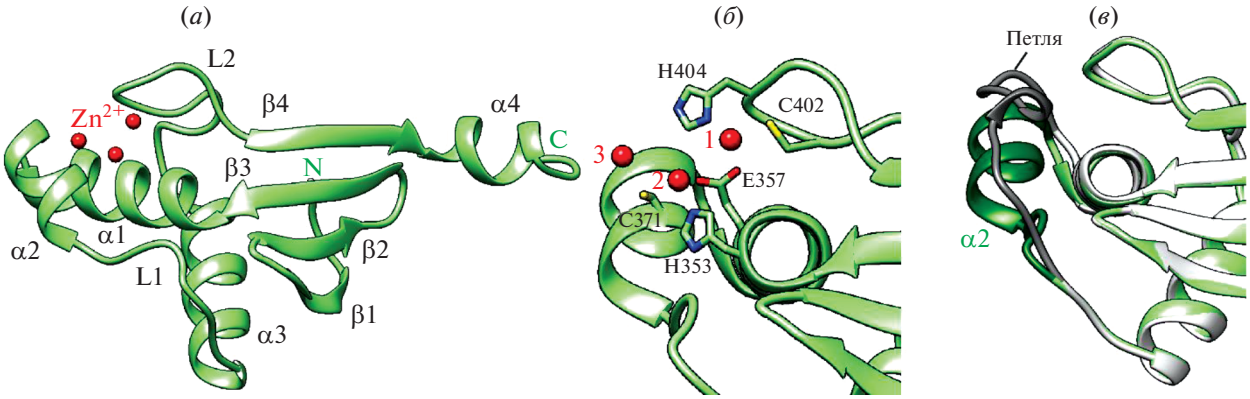


Рис. 10. Кристаллические структуры С-концевого домена MutL из *A. aeolicus* (aaMutL-CTD). (*а*) Кристаллическая структура мономера aaMutL-CTD с тремя ионами цинка (PDB: 5Z42); (*б*) цинк-связывающий центр aaMutL-CTD; (*в*) совмещение двух структур aaMutL-CTD (PDB: 5Z42 и 5Z41) – с тремя ионами цинка (зеленый цвет) и с одним ионом цинка (серый цвет). Петля в структуре 5Z41 с единственным ионом цинка и α-спираль, образующаяся при связывании трех ионов цинка в структуре 5Z42, обозначены темно-серым и темно-зеленым цветами соответственно. Предложено согласно [118].

этой области образуется петля [118]. Следует отметить, что способность белка aaMutL связывать большее число ионов цинка (по сравнению с другими полученными бактериальными MutL) может являться следствием особенностей строения данного белка (отсутствия регуляторного домена [73]). Предполагают, что связывание нескольких ионов цинка необходимо для формирования правильной структуры каталитического центра aaMutL. В доказательство этого предположения свидетельствует, что способность гидролизовать ДНК у aaMutL, связанного с тремя ионами Zn^{2+}, в три раза превышает активность aaMutL с одним ионом Zn^{2+}.

Наличие в реакционной смеси только ионов Zn^{2+} не стимулирует гидролиз суперскрученной плазмиды для всех выделенных бактериальных MutL [31]. Очевидно, что различное влияние ионов Zn^{2+} на структуру белков MutL обусловливает и различное влияние этих ионов на эндонуклеазную функцию белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на значительное количество информации о функционировании MMR, которая имеется на сегодняшний день, многие детали механизма этого процесса только предстоит узнать. На основе проведенного нами анализа данных литературы представляется возможным наметить направления дальнейших исследований этой системы репарации.

Так, долгое время полагали, что MutL, главным образом, координирует белок–белковые взаимодействия во время узнавания повреждения и удаления фрагмента одной из цепей ДНК. Открытие эндонуклеазной функции MutLα, а также MutL из бактерий, не содержащих MutH, привело к пониманию ключевой роли MutL в инициации репарации. Механизм этого процесса, как и влияние MutS и факторов процессивности на функционирование MutL, нуждается в дальнейшем исследовании.

В аспектах, касающихся взаимодействия MutL с ДНК, также существует множество невыясненных моментов. Например, не предложен единый механизм, который мог бы объяснить способ распознавания “дочерней” цепи ДНК в тех организмах, где отсутствует эндонуклеаза MutH. Также следует детально изучить процесс внесения одноцепочечного разрыва белком MutL в ходе MMR в бактериальных системах.

Связывание и гидролиз ДНК белком MutL зависят от многих факторов, которые нуждаются в систематизации и уточнении. Так, эндонуклеазная активность MutL модулируется ионами двухвалентных металлов. Тем не менее определенной корреляции между природой металла и гидролитической способностью разных белков MutL не наблюдается. Кроме того, считается, что β-“зажим” способен повышать эндонуклеазную активность MutL, обеспечивая правильную локализацию ДНК в каталитическом центре белка или связывание эндонуклеазного домена MutL с ДНК. Однако есть группа организмов, для которых не выявлено влияние β-“зажима” на эндонуклеазную функцию. Остается неясным, как в таких организмах происходит процесс дискриминации “дочерней” цепи. В дальнейших исследованиях должна быть уточнена роль ATP в функционировании MutL, так как присутствие ATP в некоторых организмах активирует эндонуклеазную функцию MutL, а в других – ингибирует.

В заключение нужно отметить, что система репарации "мисматчей" не только устраняет повреждения в ДНК, но и взаимодействует с другими белковыми комплексами в клетке. Исследование функционирования MutL в разных организмах является ключом к детальному пониманию того, как работает MMR и какие клеточные процессы связаны с этой системой. Эти данные позволят лучше понять природу заболеваний, связанных с накоплением мутаций в ДНК, что может быть использовано в биомедицинских целях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за помощь в подготовке иллюстративного материала студентке химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова А.В. Павловой и старшему научному сотруднику НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова В.А. Анашкину.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-34-00768).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kunkel T.A., Erie D.A.* // Annu. Rev. Biochem. 2005. V. 74. P. 681–710. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133243
2. *Modrich P., Lahue R.* // Annu. Rev. Biochem. 1996. V. 65. P. 101–133. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.000533
3. *Jiricny J.* // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013. V. 5. P. a012633. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012633
4. *Arana M.E., Kunkel T.A.* // Semin. Cancer Biol. 2010. V. 20. P. 304–311. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.10.003
5. *Guarné A.* // Progress in Molecular Biology and Translational Science. 2012. P. 41–70. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387665-2.00003-1
6. *Peltomäki P.* // J. Clin. Oncol. 2003. V. 21. P. 1174–1179. https://doi.org/10.1200/JCO.2003.04.060
7. *Liu J., Hanne J., Britton B.M., Bennett J., Kim D., Lee J.-B., Fishel R.* // Nature. 2016. V. 539. P. 583–587. https://doi.org/10.1038/nature20562
8. *Kadyrova L.Y., Kadyrov F.A.* // DNA Repair (Amst). 2016. V. 38. P. 42–49. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.11.023
9. *Liu J., Lee J.-B., Fishel R.* // J. Mol. Biol. 2018. V. 430. P. 4456–4468. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.05.039
10. *Modrich P.* // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 6597–6600.
11. *Grilley M., Griffith J., Modrich P.* // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 11830–11837.
12. *Lamers M.H., Perrakis A., Enzlin J.H., Winterwerp H.H.K., Wind N. de, Sixma T.K.* // Nature. 2000. V. 407. P. 711–717. https://doi.org/10.1038/35037523
13. *Lahue R., Au K., Modrich P.* // Science. 1989. V. 245. P. 160–164. https://doi.org/10.1126/science.2665076
14. *Acharya S., Foster P.L., Brooks P., Fishel R.* // Mol. Cell. 2003. V. 12. P. 233–246. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00219-3
15. *Obmolova G., Ban C., Hsieh P., Yang W.* // Nature. 2000. V. 407. P. 703–710. https://doi.org/10.1038/35037509
16. *Bjornson K.P., Modrich P.* // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 18557–18562. https://doi.org/10.1074/jbc.M301101200
17. *Antony E., Hingorani M.M.* // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 13115–13128. https://doi.org/10.1021/bi049010t
18. *Hingorani M.M.* // DNA Repair (Amst). 2016. V. 38. P. 24–31. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.11.017
19. *Groothuizen F.S., Winkler I., Cristóvão M., Fish A., Winterwerp H.H., Reumer A., Marx A.D., Hermans N., Nicholls R.A., Murshudov G.N., Lebbink J.H., Friedhoff P., Sixma T.K.* // Elife. 2015. V. 4. e06744. https://doi.org/10.7554/eLife.06744
20. *Dutta R., Inouye M.* // Trends Biochem. Sci. 2000. V. 25. P. 24–28. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01503-0
21. *Sancar A., Hearst J.* // Science. 1993. V. 259. P. 1415–1420. https://doi.org/10.1126/science.8451638
22. *Au K.G., Welsh K., Modrich P.* // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 12142–12148.
23. *Welsh K.M., Lu A.L., Clark S., Modrich P.* // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 15624–15629.
24. *Hall M.C.* // EMBO J. 1998. V. 17. P. 1535–1541. https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1535
25. *Lopez de Saro F.J., O'Donnell M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2001. V. 98. P. 8376–8380. https://doi.org/10.1073/pnas.121009498
26. *Correa E.M.E., Martina M.A., Tullio L. De, Argaraña C.E., Barra J.L.* // DNA Repair (Amst). 2011. V. 10. P. 1106–1113. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.08.007
27. *Pillon M.C., Lorenowicz J.J., Uckelmann M., Klocko A.D., Mitchell R.R., Chung Y.S., Modrich P., Walker G.C.,*

Simmons L.A., Friedhoff P., Guarné A. // Mol. Cell. 2010. V. 39. P. 145–151. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.027

28. *Duppatla V., Bodda C., Urbanke C., Friedhoff P., Rao D.N.* // Biochem. J. 2009. V. 423. P. 265–277. https://doi.org/10.1042/BJ20090626
29. *Iino H., Kim K., Shimada A., Masui R., Kuramitsu S., Fukui K.* // Biosci. Rep. 2011. V. 31. P. 309–322. https://doi.org/10.1007/s00792-015-0745-2
30. *Fukui K., Nishida M., Nakagawa N., Masui R., Kuramitsu S.* // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 12136–12145. https://doi.org/10.1074/jbc.M800110200
31. *Монахова М.В., Пенкина А.И., Павлова А.В., Лящук А.М., Кучеренко В.В., Алексеевский А.В., Лунин В.Г., Фридхофф П., Клуг Г., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А.* // Биохимия. 2018. V. 83. P. 281–293. https://doi.org/10.1134/S0006297918030082
32. *Bende S.M., Grafström R.H.* // Nucleic Acids Res. 1991. V. 19. P. 1549–1555. https://doi.org/10.1093/nar/19.7.1549
33. *Drotschmann K., Hall M.C., Shcherbakova P.V., Wang H., Erie D.A., Brownewell F.R., Kool E.T., Kunkel T.A.* // Biol. Chem. 2002. V. 383. P. 969–975. https://doi.org/10.1515/BC.2002.103
34. *Drummond J., Li G., Longley M., Modrich P.* // Science. 1995. V. 268. P. 1909–1912. https://doi.org/10.1126/science.7604264
35. *Li G.M., Modrich P.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 1995. V. 92. P. 1950–1954. https://doi.org/10.1073/pnas.92.6.1950
36. *Strand M., Prolla T.A., Liskay R.M., Petes T.D.* // Nature. 1993. V. 365. P. 274–276. https://doi.org/10.1038/365274a0
37. *Harfe B.D., Jinks-Robertson S.* // Annu. Rev. Genet. 2000. V. 34. P. 359–399. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.359
38. *McCulloch S.D., Gu L., Li G.-M.* // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 3891–3896. https://doi.org/10.1074/jbc.M210687200
39. *Bowen N., Smith C.E., Srivatsan A., Willcox S., Griffith J.D., Kolodner R.D.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2013. V. 110. P. 18472–18477. https://doi.org/10.1073/pnas.1318971110
40. *Szankasi P., Smith G.* // Science. 1995. V. 267. P. 1166–1169. https://doi.org/10.1126/science.7855597
41. *Tishkoff D.X., Boerger A.L., Bertrand P., Filosi N., Gaida G.M., Kane M.F., Kolodner R.D.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 1997. V. 94. P. 7487–7492. https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7487
42. *Genschel J., Bazemore L.R., Modrich P.* // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 13302–13311. https://doi.org/10.1074/jbc.M111854200
43. *Umar A., Buermeyer A.B., Simon J.A., Thomas D.C., Clark A.B., Liskay R.M., Kunkel T.A.* // Cell. 1996. V. 87. P. 65–73. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81323-9
44. *Johnson R.E., Kovvali G.K., Guzder S.N., Amin N.S., Holm C., Habraken Y., Sung P., Prakash L., Prakash S.* // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 27987–27990. https://doi.org/10.1074/jbc.271.45.27987
45. *Almawi A.W., Scotland M.K., Randall J.R., Liu L., Martin H.K., Sacre L., Shen Y., Pillon M.C., Simmons L.A., Sutton M.D., Guarné A.* // Nucleic Acids Res. 2019. V. 47. P. 4831–4842. https://doi.org/10.1093/nar/gkz115
46. *Genschel J., Modrich P.* // Mol. Cell. 2003. V. 12. P. 1077–1086. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00428-3
47. *Dzantiev L., Constantin N., Genschel J., Iyer R.R., Burgers P.M., Modrich P.* // Mol. Cell. 2004. V. 15. P. 31–41. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.016
48. *Lin Y.-L., Shivji M.K.K., Chen C., Kolodner R., Wood R.D., Dutta A.* // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 1453–1461. https://doi.org/10.1074/jbc.273.3.1453
49. *Qiu H., Wang Y.* // J. Proteome Res. 2009. V. 8. P. 1983–1991. https://doi.org/10.1021/pr8009319
50. *Zhang Y., Yuan F., Presnell S.R., Tian K., Gao Y., Tomkinson A.E., Gu L., Li G.-M.* // Cell. 2005. V. 122. P. 693–705. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.027
51. *Longley M.J., Pierce A.J., Modrich P.* // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 10917–10921. https://doi.org/10.1074/jbc.272.16.10917
52. *Constantin N., Dzantiev L., Kadyrov F.A., Modrich P.* // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 39752–39761. https://doi.org/10.1074/jbc.M509701200
53. *Kadyrov F.A., Genschel J., Fang Y., Penland E., Edelmann W., Modrich P.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2009. V. 106. P. 8495–8500. https://doi.org/10.1073/pnas.0903654106
54. *Flores-Rozas H., Kolodner R.D.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 1998. V. 95. P. 12404–12409. https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12404
55. *Nishant K.T., Plys A.J., Alani E.* // Genetics. 2008. V. 179. P. 747–755. https://doi.org/10.1534/genetics.108.086645
56. *Cannavo E., Marra G., Sabates-Bellver J., Menigatti M., Lipkin S.M., Fischer F., Cejka P., Jiricny J.* // Cancer Res. 2005. V. 65. P. 10759–10766. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2528
57. *Ghodgaonkar M.M., Lazzaro F., Olivera-Pimentel M., Artola-Borán M., Cejka P., Reijns M.A., Jackson A.P., Plevani P., Muzi-Falconi M., Jiricny J.* // Mol. Cell. 2013. V. 50. P. 323–332. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.019
58. *Lujan S.A., Williams J.S., Clausen A.R., Clark A.B., Kunkel T.A.* // Mol. Cell. 2013. V. 50. P. 437–443. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.017
59. *Liu Y., Kadyrov F.A., Modrich P.* // DNA Repair (Amst). 2011. V. 10. P. 1145–1153. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.08.012
60. *Kadyrova L.Y., Blanko E.R., Kadyrov F.A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2011. V. 108. P. 2753–2758. https://doi.org/10.1073/pnas.1015914108

61. *Li F., Mao G., Tong D., Huang J., Gu L., Yang W., Li G.-M.* // Cell. 2013. V. 153. P. 590–600. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.025
62. *Liu D., Keijzers G., Rasmussen L.J.* // Mutat. Res. 2017. V. 773. P. 174–187. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.07.001
63. *Pluciennik A., Dzantiev L., Iyer R.R., Constantin N., Kadyrov F.A., Modrich P.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 16066–16071. https://doi.org/10.1073/pnas.1010662107
64. *Moldovan G.-L., Pfander B., Jentsch S.* // Cell. 2007. V. 129. P. 665–679. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.003
65. *Mossi R., Jónsson Z.O., Allen B.L., Hardin S.H., Hübscher U.* // J. Biol. Chem. 1997. https://doi.org/10.1074/jbc.272.3.1769
66. *Clark A.B., Valle F., Drotschmann K., Gary R.K., Kunkel T.A.* // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 36498–36501. https://doi.org/10.1074/jbc.C000513200
67. *Genschel J., Kadyrova L.Y., Iyer R.R., Dahal B.K., Kadyrov F.A., Modrich P.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2017. V. 114. P. 4930–4935. https://doi.org/10.1073/pnas.1702561114
68. *Gradia S., Acharya S., Fishel R.* // Cell. 1997. V. 91. P. 995–1005. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80490-0
69. *Pillon M.C., Babu V.M.P., Randall J.R., Cai J., Simmons L.A., Sutton M.D., Guarné A.* // Nucleic Acids Res. 2015. V. 43. P. 10746–10759. https://doi.org/10.1093/nar/gkv918
70. *Friedhoff P., Li P., Gotthardt J.* // DNA Repair (Amst). 2016. V. 38. P. 50–57. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.11.013
71. *Pillon M.C., Miller J.H., Guarné A.* // DNA Repair (Amst). 2011. V. 10. P. 87–93. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.10.003
72. *Liu L., Ortiz Castro M.C., Rodríguez González J., Pillon M.C., Guarné A.* // DNA Repair (Amst). 2019. V. 73. P. 1–6. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.10.003
73. *Fukui K., Baba S., Kumasaka T., Yano T.* // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 16990–17000. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.739664
74. *Shimada A., Kawasoe Y., Hata Y., Takahashi T.S., Masui R., Kuramitsu S., Fukui K.* // FEBS J. 2013. V. 280. P. 3467–3479. https://doi.org/10.1111/febs.12344
75. *Kadyrov F.A., Dzantiev L., Constantin N., Modrich P.* // Cell. 2006. V. 126. P. 297–308. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.039
76. *Lyer R.R., Pluciennik A., Burdett V., Modrich P.L.* // Chem. Rev. 2006. V. 106. P. 302–323. https://doi.org/10.1021/cr0404794
77. *Manhart C.M., Alani E.* // DNA Repair (Amst.). 2016. V. 38. P. 84–93. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.11.024
78. *Zakharyevich K., Tang S., Ma Y., Hunter N.* // Cell. 2012. V. 149. P. 334–347. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.023
79. *Ranjha L., Anand R., Cejka P.* // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. P. 5674–5686. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.533810
80. *Duroc Y., Kumar R., Ranjha L., Adam C., Guérois R., Md Muntaz K., Marsolier-Kergoat M.-C., Dingli F., Laureau R., Loew D., Llorente B., Charbonnier J.-B., Cejka P., Borde V.* // Elife. 2017. V. 6. e21900. https://doi.org/10.7554/eLife.21900
81. *Gomes-Pereira M.* // Hum. Mol. Genet. 2004. V. 13. P. 1815–1825. https://doi.org/10.1093/hmg/ddh186
82. *Pluciennik A., Burdett V., Baitinger C., Iyer R.R., Shi K., Modrich P.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2013. V. 110. P. 12277–12282. https://doi.org/10.1073/pnas.1311325110
83. *Pinto R.M., Dragileva E., Kirby A., Lloret A., Lopez E., Claire J. St., Panigrahi G.B., Hou C., Holloway K., Gillis T., Guide J.R., Cohen P.E., Li G.-M., Pearson C.E., Daly M.J., Wheeler V.C.* // PLoS Genet. / ed. Zeitlin S.O. 2013. V. 9. P. e1003930. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003930
84. *Halabi A., Fuselier K.T.B., Grabczyk E.* // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. P. 4022–4032. https://doi.org/10.1093/nar/gky143
85. *Zhao X., Zhang Y., Wilkins K., Edelmann W., Usdin K.* // PLos Genet. 2018. V. 14. P. e1007719. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007719
86. *Lee J.-M., Correia K., Loupe J., Kim K.-H., Barker D., Hong E.P., Chao M.J., Long J.D., Lucente D., Vonsattel J.P.G., Pinto R.M., Abu Elneel K., Ramos E.M., Mysore J.S., Gillis T., Wheeler V.C., MacDonald M.E., Gusella J.F., McAllister B., Massey T., Medway C., Stone T.C., Hall L., Jones L., Holmans P., Kwak S., Ehrhardt A.G., Sampaio C., Ciosi M., Maxwell A., Chatzi A., Monckton D.G., Orth M., Landwehrmeyer B.G., Paulsen J.S., Dorsey E.R., Shoulson I., Myers R.H.* // Cell. 2019. V. 178. P. 887–900. e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.036
87. *Ciosi M., Maxwell A., Cumming S.A., Hensman Moss D.J., Alshammari A.M., Flower M.D., Durr A., Leavitt B.R., Roos R.A.C., Holmans P., Jones L., Langbehn D.R., Kwak S., Tabrizi S.J., Monckton D.G.* // EBioMedicine. 2019. V. 48. P. 568–580. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.09.020
88. *Kadyrova L.Y., Gujar V., Burdett V., Modrich P.L., Kadyrov F.A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2020. V. 117. P. 3535–3542. https://doi.org/10.1073/pnas.1914718117
89. *Guarné A., Charbonnier J.-B.* // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2015. V. 117. P. 149–156. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.002
90. *Fukui K., Iino H., Baba S., Kumasaka T., Kuramitsu S., Yano T.* // Biochim. Biophys. Acta – Proteins Proteomics. 2017. V. 1865. P. 1178–1187. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.06.024
91. *Ban C., Yang W.* // Cell. 1998. V. 95. P. 541–552. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81621-9
92. *Guarné A.* // EMBO J. 2001. V. 20. P. 5521–5531. https://doi.org/10.1093/emboj/20.19.5521
93. *Ban C., Junop M., Yang W.* // Cell. 1999. V. 97. P. 85–97. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80717-5
94. *Arana M.E., Holmes S.F., Fortune J.M., Moon A.F., Pedersen L.C., Kunkel T.A.* // DNA Repair (Amst.). 2010. V. 9. P. 448–457. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.01.010
95. *Banasik M., Sachadyn P.* // Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. 2014. V. 769. P. 69–79. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.07.006
96. *Räschle M., Dufner P., Marra G., Jiricny J.* // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 21810–21820. https://doi.org/10.1074/jbc.M108787200

97. *Yang W.* // Mutat. Res. Repair. 2000. V. 460. P. 245–256. https://doi.org/10.1016/S0921-8777(00)00030-6
98. *Sacho E.J., Kadyrov F.A., Modrich P., Kunkel T.A., Erie D.A.* // Mol. Cell. 2008. V. 29. P. 112–121. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.030
99. *Schopf F.H., Biebl M.M., Buchner J.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017. V. 18. P. 345–360. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.20
100. *Polosina Y.Y., Cupples C.G.* // BioEssays. 2010. V. 32. P. 51–59. https://doi.org/10.1002/bies.200900089
101. *Mauris J., Evans T.C.* // PLoS One / ed. Marinus M.G. 2009. V. 4. P. e7175. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007175
102. *Guarné A., Ramon-Maiques S., Wolff E.M., Ghirlando R., Hu X., Miller J.H., Yang W.* // EMBO J. 2004. V. 23. P. 4134–4145. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600412
103. *Schorzman A.N., Perera L., Cutalo-Patterson J.M., Pedersen L.C., Pedersen L.G., Kunkel T.A., Tomer K.B.* // DNA Repair (Amst). 2011. V. 10. P. 454–465. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.01.010
104. *Hall M.C., Wang H., Erie D.A., Kunkel T.A.* // J. Mol. Biol. 2001. V. 312. P. 637–647. https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4958
105. *Robertson A., Pattishall S.R., Matson S.W.* // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 8399–8408. https://doi.org/10.1074/jbc.M509184200
106. *Junop M.* // DNA Repair (Amst.). 2003. V. 2. P. 387–405. https://doi.org/10.1016/S1568-7864(02)00245-8
107. *Monakhova M., Ryazanova A., Kunetsky V., Li P., Shilkin E., Kisil O., Rao D.N., Oretskaya T., Friedhoff P., Kubareva E.* // Biochimie. 2020. V. 171–172. P. 43–54. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.02.004
108. *Niedziela-Majka A., Maluf N.K., Antony E., Lohman T.M.* // Biochemistry. 2011. V. 50. P. 7868–7880. https://doi.org/10.1021/bi200753b
109. *Монахова М.В., Кубарева Е.А., Романова Е.А., Семкина А.С., Набережнов Д.С., Рао Д.Н., Зацепин Т.С., Орецкая Т.С.* // Биоорган. химия. 2019. Т. 45. С. 303–314. [*Monakhova M.V., Kubareva E.A., Romanova E.A., Semkina A.S., Naberezhnov D.S., Rao D.N., Zatsepin T.S., Oretskaya T.S.* // Russ. J. Bioorg. Chem. V. 45. P. 144–154.] https://doi.org/10.1134/S1068162019020079
110. *Bjornson K.P., Allen D.J., Modrich P.* // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 3176–3183. https://doi.org/10.1021/bi992286u
111. *Gueneau E., Dherin C., Legrand P., Tellier-Lebegue C., Gilquin B., Bonnesoeur P., Londino F., Quemener C., Du M.-H. Le, Márquez J.A., Moutiez M., Gondry M., Boiteux S., Charbonnier J.-B.* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2013. V. 20. P. 461–468. https://doi.org/10.1038/nsmb.2511
112. *Kadyrov F.A., Holmes S.F., Arana M.E., Lukianova O.A., O'Donnell M., Kunkel T.A., Modrich P.* // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 37181–37190. https://doi.org/10.1074/jbc.M707617200
113. *Kosinski J., Plotz G., Guarné A., Bujnicki J.M., Friedhoff P.* // J. Mol. Biol. 2008. V. 382. P. 610–627. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.056
114. *Erdeniz N., Nguyen M., Deschênes S.M., Liskay R.M.* // DNA Repair (Amst.). 2007. V. 6. P. 1463–1470. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.04.013
115. *Yang W.* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2008. V. 15. P. 1228–1231. https://doi.org/10.1038/nsmb.1502
116. *Stapleton B., Walker L.R., Logan T.M.* // Biochemistry. 2013. V. 52. P. 1927–1938. https://doi.org/10.1021/bi301608p
117. *Namadurai S., Jain D., Kulkarni D.S., Tabib C.R., Friedhoff P., Rao D.N., Nair D.T.* // PLoS One. 2010. V. 5. e13726. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013726
118. *Fukui K., Baba S., Kumasaka T., Yano T.* // FEBS Lett. 2018. V. 592. P. 1611–1619. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13050
119. *Groothuizen F.S., Sixma T.K.* // DNA Repair (Amst.). 2016. V. 38. P. 14–23. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.11.012

Functioning of MutL Protein of the DNA Mismatch Repair System in Different Organisms

M. V. Monakhova*, M. A. Milakina*, R. M. Trikin, T. S. Oretskaya*,#, and E. A. Kubareva***

#Phone: +7 (916) 206-41-02; fax: +7 (495) 939-31-81; e-mail: oretskaya@belozersky.msu.ru

** Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry and A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leninskye gory 1, Moscow, 119991 Russia*

*** MIREA – Russian Technological University, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia*

All organisms possess a DNA mismatch repair system, MMR. Disruptions in MMR functioning at any step of DNA repair lead to accumulation of mutations in the cells, thus decreasing the viability. In most organisms, a protein named MutL plays a key role in elimination of mismatches. MutL is capable of introducing a single strand break in the daughter strand of the DNA. This review article summarizes the information about the DNA mismatch repair systems in eukaryotes and prokaryotes, structure of MutL, and interaction of MutL with DNA and other MMR proteins.

Keywords: DNA mismatch repair, MutL proteins, endonuclease activity

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 580–592

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.112

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ Ras-БЕЛКОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

© 2020 г. С. Г. Клочков*, #, М. Е. Неганова*, Ю. Р. Александрова*

**Институт физиологически активных веществ РАН,*
Россия, 142432 Московская обл., Черноголовка, Северный проезд, 1

Поступила в редакцию 17.02.2020 г.
После доработки 27.02.2020 г.
Принята к публикации 28.02.2020 г.

Разработка эффективных противоопухолевых препаратов считается одной из приоритетных задач современного здравоохранения. Для химиотерапии опухолей используются ингибиторы белков, ферментов, рецепторов, регулирующих сигнальные пути опухолевых клеток, индукторы апоптоза. Наиболее значимые и изучаемые сигнальные пути – это пути Raf/MEK/ERK и фосфоинозитид-3-киназы. Изменения в каскадах этих путей ведут к модуляции многих клеточных функций – роста и выживания клетки, пролиферации, дифференциации, адгезии. Эти сигнальные каскады тесно связаны с Ras-белками. Онкогенные формы Ras-белков детектируются в большом числе опухолевых заболеваний – более 30% всех форм новообразований. В настоящем обзоре рассмотрены литературные данные за последние 30 лет по исследованию ключевых этапов сигнальных каскадов, инициируемых онкобелками. Отдельно проанализированы особенности процессинга Ras-белков, рассматриваемые в настоящее время как перспективные молекулярные мишени для разработки противоопухолевых препаратов. Приведены и обсуждены литературные данные о новых стратегиях поиска эффективных антинеопластов на основе ингибиторов сигнальных путей Ras-белков.

Ключевые слова: онкогенные белки Ras, процессинг, фарнезилтрансфераза, противоопухолевые препараты

DOI: 10.31857/S0132342320050115

ВВЕДЕНИЕ

Одной из наиболее значимых причин смертности населения, независимо от пола, возраста и качества жизни, являются онкологические заболевания. Естественно, эти заболевания и стратегии создания противоопухолевых лекарственных препаратов находятся в зоне пристального внимания исследователей во всем мире. В результате успешного развития современной молекулярной биологии было обнаружено, что ряд белков и генов играют критическую роль в канцерогенезе. Необратимые изменения в клеточном генетическом содержании считаются основной причиной канцерогенеза, поскольку они могут модулировать как экспрессию генов, так и функционирование трансляционных продуктов, которые связаны с регуляцией роста и дифференцировки клеток. С появлением современных технологий и благодаря непрерывным усилиям исследователей был достигнут огромный прогресс в выявлении и понимании роли мутаций и изменений генов в структуре процессов образования злокачественных опухолей человека и канцерогенеза в целом.

Для терапии разных типов опухолей используются ингибиторы белков, ферментов, рецепторов, регулирующих сигнальные пути опухолевых клеток, индукторы апоптоза, стероидные соедине-

Akt – протеин киназа B; ATF2-активирующий фактор транскрипции 2; BCL – регулятор апоптоза – внутриклеточный белковый фактор; CAAX – “C” – цистеин, “A” – любая алифатическая аминокислота, “X” – любая аминокислота; COX-2 – циклооксигеназа 2; EGF – фактор эпидермального роста; ERK – внеклеточная сигнально-регулируемая киназа; F – фарнезил; FDP – фарнезилдифосфат; FGF – фактор роста фибробластов; FGF 2 – фактор роста фибробластов; FPP – фарнезилпирофосфат; FTI – ингибитор фарнезилтрансферазы; FT-аза – фарнезилтрансфераза; GAP – белок, активирующий GTP-азу; GDP – гуанозин-5'-дифосфат; GEF – фактор обмена гуанинового нуклеотида; GGT-аза – геранилгеранилтрансфераза; GDP – гуанозин-5'-дифосфат; GTP – гуанозин-5'-трифосфат; GTP-аза – гуанозин трифосфатаза; HIF-1α –индуцированный гипоксией фактор-1α; ICMT – изопренилцистеинкарбоксиметилтрансфераза; MEK – киназа митоген-активируемой киназы; NF-κB – ядерный фактор κB; NGF – фактор роста нервов; PDGF – тромбоцитарный фактор роста; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; Raf – эффекторная киназа Ras; RCE1 – эндопептидаза, отщепляющая CAAX-фрагмент белка Ras; RTK – рецепторные тирозинкиназы; VEGFA – фактор роста эндотелия сосудов A.

Автор для связи: (тел.: +7 (496) 524-25-25; эл. почта: klochkov@ipac.ac.ru).

ния и вакцины. К наиболее многообещающим и изучаемым сигнальным путям принадлежат сигнальные пути Raf/MEK/ERK и фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) [1]. Изменения в каскадах этих сигнальных путей ведут к нарушению многих клеточных функций – функций роста и выживания клетки, пролиферации, дифференциации, адгезии. Эти сигнальные каскады тесно связаны с Ras-белками. Онкогенные формы Ras-белков детектируются в большом числе опухолевых клеток– их содержат около 30% всех форм новообразований, в том числе свыше 50% рака ободочной кишки, свыше 30% рака легких и более 90% опухолей поджелудочной железы [2, 3]. Онкогенный потенциал белков семейства Ras, таких как H-Ras, K-Ras и N-Ras, в различных опухолях убедительно доказан исследованиями нескольких десятилетий [4, 5].

Анализ образцов опухолевых клеток показал, что изменение в гене белка K-Ras наиболее часто сопровождается также изменениями генов N-Ras и H-Ras [5, 6]. Онкосопряженные изменения в гене белка K-Ras наиболее часто обнаруживаются при панкреатических карциномах, колоректальных опухолях и злокачественных новообразованиях легких, в то время как мутированный H-Ras наиболее часто встречается в дерматологических и злокачественных новообразованиях головы и шеи, гематологические злокачественные опухоли часто сопряжены с мутациями N-Ras [5]. С момента открытия онкобелков Ras в 1960-х годах в многочисленных исследованиях изучался механизм их активности и связанные с ними регуляторные пути.

Гиперэкспрессия онкогенов Ras реализует свою антиапоптотическую функцию через несколько эффекторных путей. Так, активация сигнальных путей PI3K-Akt и Raf-MEK-MAPK приводит к фосфорилированию и инактивации проапоптотического белка BAD [7], блокируя тем самым процесс апоптоза. Кроме того, белки Ras регулируют и многие транскрипционные факторы, связанные с началом и прогрессированием клеточного цикла, включая ядерный фактор κB (NF-κB) и активирующий фактор транскрипции 2 (ATF2) [5], сверхактивация которых в свою очередь способствует дисрегуляции процессов пролиферации неопластических клеток, приводя к их бесконтрольному делению [7].

Онкогенные белки Ras в опухолевых клетках могут способствовать и ангиогенезу, увеличивая транскрипционную активацию генов, контролирующих данный процесс через ряд сигнальных каскадов [8]. В частности, запуск вышеупомянутых путей PI3K-Akt и Raf-MEK-MAPK приводит к стабилизации индуцированного гипоксией фактора 1α (HIF-1α), который способен активировать промотор фактора роста эндотелия сосудов A (VEGFA) [9–12], играющего ключевую роль в индукции пролиферации эндотелиальных клеток и прорастания новых кровеносных сосудов [5]. Кроме того, посредством активации фермента циклооксигеназы 2 (COX-2) Ras могут стимулировать выработку и других проангиогенных факторов, в частности, тромбоцитарного фактора роста (PDGF) и основного фактора роста фибробластов (FGF-2) [13].

Первые успехи в создании лекарственных препаратов, ингибирующих сигнальные пути Ras, вдохновили исследователей к изучению этих белков и поиску новых потенциальных лекарственных препаратов, направленных на изменение их функций. В настоящем обзоре рассмотрены ключевые этапы сигнальных каскадов, инициируемых онкогенными белками Ras, и рассматриваемых в настоящее время как перспективные молекулярные мишени для разработки противоопухолевых препаратов.

ПРОЦЕССИНГ ОНКОГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *Ras*

Онкогены семейства Ras являются генами наиболее распространенных и известных белков, которые регулируют клеточную пролиферацию, выживание, рост опухолевой клетки, а также ряд других функций, обеспечивающих процесс малигнизации клеток. К настоящему времени массив белков Ras разделяется на пять основных семейств – Ran, Ras, Rab, Rho и Arf [14]. Семейство онкобелков Ras представлено четырьмя классами: HRas, KRas4a, KRas4b, и NRas [3, 15]. Эти белки являются GTP-азами, работающими в качестве молекулярных переключателей: “включено” – когда белок связан с GTP и “выключено”, когда белок связан с GDP. Ras-GTP в свою очередь связывается с большим количеством разнообразных эффекторных белков. Взаимодействия белков Ras с эффекторами ведут к запуску каскада сигнальных путей, передающих экстраклеточный стимул внутрь клетки [16, 17]. В качестве внеклеточных сигналов выступают фактор эпидермального роста (EGF), фактор роста нервов (NGF), фактор роста тромбоцитов (PDGF), фактор роста фибробластов (FGF), которые активируют рецепторные тирозинкиназы (RTK). Данные экстраклеточные сигналы активируют рецепторные тирозинкиназы, передавая сигнал на Ras-белки и запуская два основополагающих сигнальных пути развития опухолевой клетки: Raf/MEK/ERK и PI3K [18–21]. В опухолевых клетках сигнальные пути, запускаемые белками Ras, являются ключевыми для процессов пролиферации и дифференциации, они определяют как выживание клетки, так и ее способность избегать апоптоза [22] (рис. 1).

Превращение Ras-GTP в Ras-GDP является очень медленным процессом и происходит с участием регуляторных белков. Белок GAP (GTPase-activating protein) катализирует превращение Ras-

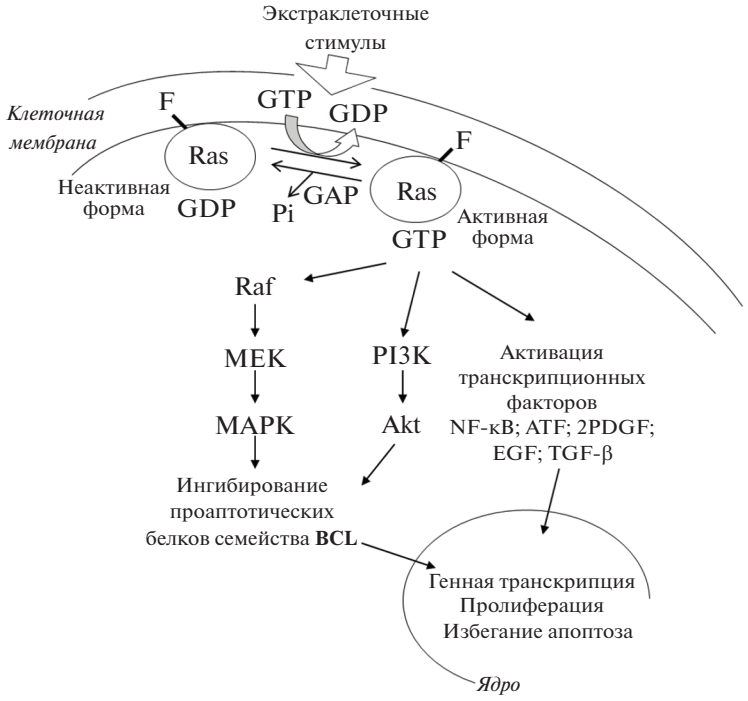


Рис. 1. Сигнальные пути, запускаемые белками Ras. Онкобелки Ras являются GTP-азами. Когда Ras связан с GTP – он активен, форма белка, связанная с GDP, – не активна. Ras-GTP связывается с большим количеством разнообразных эффекторных белков, которые по каскадам сигнальных путей передают стимул внутрь клетки, модулируя процессы пролиферации, дифференциации клетки и ее способность избегать апоптоза.

GTP в Ras-GDP (включено-выключено), тогда как GEF (guanine nucleotide exchange factor) катализирует выход GDP из комплекса (выключено-включено) [23]. В дополнение к значительной роли мутированных онкобелков Ras следует заметить, что не мутированные белки Ras также присутствуют в опухолях, и это является необходимым условием малигнизации. Так, например, для развития опухоли, вызванной онкобелком K-Ras, необходимо наличие не мутированных функционирующих H-Ras или N-Ras [24–26].

Для того чтобы Ras-белки стали активными и участвовали в каскаде передачи экстраклеточного сигнала ростовых факторов, гормонов и цитокинов, необходимо их встраивание в мембрану клетки. Синтезируются белки семейства Ras в виде неактивного цитозольного пропептида – pro-p21. Все три основных белка семейства Ras H-, N-, и K-Ras проходят серию постранслящионных модификаций, которые можно разделить на два этапа [27] (рис. 2).

Первый этап представлен модификациями участка аминокислотной последовательности CAAX (C = цистеин, A = алифатическая аминокислота, X = любая аминокислота), который находится на *C*-конце всех белков Ras. Вначале остаток цистеина (Cys-188) алкилируется фарнезилтрансферазой (FT-аза) (обычно). Это превращение является критическим, так как обеспечивает присоединение белка Ras к мембране [29–37]. Затем участок AAX отщепляется протеолитически в эндоплазматическом ретикулуме эндопептидазой RCE1 [38]. H-Ras, N-Ras и K-Ras4A метилируются метилтрансферазой ICMT (isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase) по α-карбоксильной группе нового *C*-концевого цистеина [39–42]. Первый этап процессинга таким образом превращает белок pro-p21 в промежуточную форму – c-p21 (cytosolic processed p21). Эта форма белка Ras значительно гидрофобнее pro-p21 и слабо ассоциируется с клеточными мембранами [41, 43].

Второй этап процессинга онкогенов Ras касается белков N-Ras, H-Ras, и K-Ras4a и происходит в комплексе Гольджи. Он представляет собой пальмитоилирование цистеина гипервариабельного участка этих белков. Пальмитоилирование достоверно увеличивает способность к встраиванию в мембрану белков H-Ras и N-Ras [41]. Таким образом, встраивание белка Ras в плазматическую мембрану является результатом комбинации двух посттрансляционных модификаций.

K-Ras4b не требует пальмитоилирования и встраивается в мембрану за счет фарнезильного остатка [44]. В результате процессинга фарнезилированный белок Ras становится гидрофобным и легко встраивается в липидный бислой плазмати-

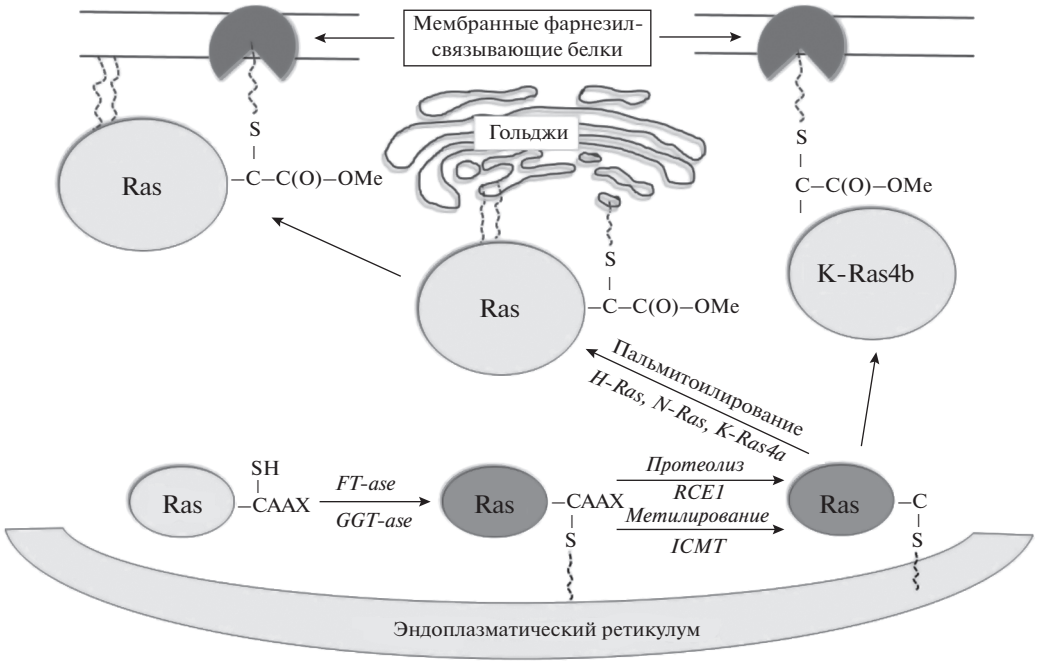


Рис. 2. Процессинг онкогенов семейства Ras. Концевой участок Ras-белка CAAX алкилируется фарнезилтрансферазой или геранилгеранилтрансферазой. Концевой пептидный участок AAX отщепляется в эндоплазматическом ретикулуме эндопептидазой RCE1 и метилируется ICMT. В комплексе Гольджи, H-Ras, N-Ras, и K-Ras4a дополнительно пальмитоилируются. K-Ras4b встраивается в мембрану посредством фарнезильного остатка. H-Ras, N-Ras, и K-Ras4a – за счет пальмитоильного и фарнезильного остатка [28].

ческой мембраны [38, 41, 44]. Это позволяет ему переключаться из неактивной GDP-связанной формы в активную GTP-связанную форму в ответ на экстраклеточный сигнал. Очень важно отметить, что существуют другие пренилтрансферазы, прежде всего это геранилгеранилтрансферазы (GGT-азы), которые присоединяют один или два 20-углеродных изопреноида к белкам Ras, что позволяет им встраиваться в мембраны. Геранилгеранилированные белки более гидрофобны чем фарнезилированные, что может служить основой для различий этих двух форм в белок-белковых взаимодействиях. GGT-азы пренилируют белки, в которых в участке CAAX остаток X представлен лейцином [45]. Таким образом, GGT-аза может пренилировать K-Ras4b и другие G-белки, которые обычно фарнезилируются [46]. Важно отметить, что сигнальные G-белки могут быть и фарнезилированы, и геранилгеранилированы, например, белок RhoB (белки семейства Rho регулируют актин цитоскелета клеток, а также их адгезию) [47]. Этот потенциал пренилирования Ras-белков предполагает, что GGT-аза может восстанавливать функции этих белков, если FT-аза заингибирована [48]. Тем не менее, не все Ras-белки пренилируются GGT-азой, и до конца не выяснены функции геранилированных белков Ras и насколько они схожи с функциями фарнезилированных Ras.

МИШЕНИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ Ras ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

Онкобелки семейства Ras экспрессированы в большом количестве опухолей и играют важную роль в их малигнизации. В связи с этим за последние 20–30 лет предпринимались неоднократные попытки разработки лекарственных препаратов, мишенью для которых служили бы эти онкобелки и их сигнальные пути [49]. Для этого использовали непосредственное взаимодействие ингибиторов как с FT-азой, так и с различными сайтами связывания самих белков Ras, а также их комплексами с белками-трансляторами и эффекторами [15, 50].

Ингибиторы обмена нуклеотидов

Активация каскада Ras и передача сигнала на дальнейшие его ступени происходит за счет обмена нуклеотидами между GTP- и GDP-связанными формами Ras. Регулируется этот процесс факторами GEF и GAP, однако активация самого Ras происходит без его ковалентной модификации нуклеотидами [51, 52]. Ras-мутации, которые изменяют их активность, нечувствительны к GAP, что приводит к накоплению мутантных форм Ras-белков в их активном состоянии, то есть связанными с GTP, и запускают сигнальные каскады, инициирующие рост онкогенных клеток [51, 53, 54].

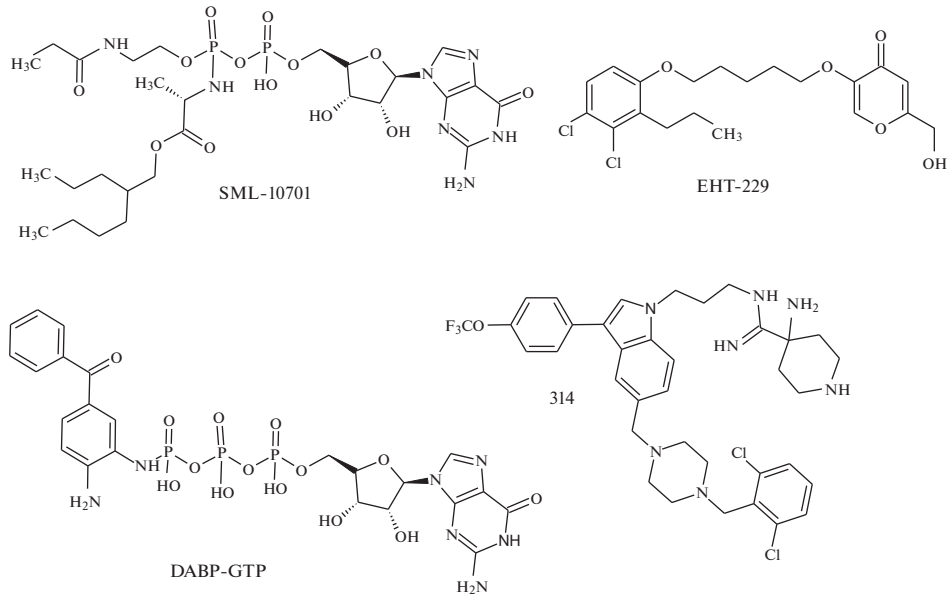


Рис. 3. Ингибиторы связывания нуклеотидного сайта Ras.

Ингибиторы нуклеотидного обмена можно разделить на два класса: соединения, которые связываются в нуклеотидном сайте Ras, и соединения, связывающиеся на сайте белка GEF.

Ингибиторы связывания нуклеотидного сайта

Этот класс ингибиторов объединяет нуклеотидные аналоги и некоторые структурно не связанные с ними молекулы. Стратегии разработки этих ингибиторов были сфокусированы на синтезе веществ, способных конкурировать с GDP и GTP в сайте их связывания на Ras. С этой целью были разработаны библиотеки нуклеотидных аналогов N2-замещенных гуанозин-5'-трифосфатов [55] и пиразоло[3,4-b]хинолиновых рибофуранозидов [56] (рис. 3). Однако ни одна из рассмотренных молекул не показала достаточного ингибирования процесса нуклеотидного обмена онкогенного Ras, что легко объясняется очень высокой аффинностью нуклеотидов к сайтам связывания Ras.

Ингибиторы комплексообразования белка Ras с белком SOS семейства GEFs

Альтернативный подход к прямому взаимодействию с нуклеотидным сайтом Ras для ингибирования связывания GTP заключается в блокировании взаимодействия с белками, которые регулируют процесс нуклеотидного обмена. Одной из перспективных молекулярных мишеней направленной Ras-терапии является комплекс белка Ras с одним из белков семейства GEFs–SOS, который отвечает за переход белка Ras в активное состояние [57]. Во время нуклеотидного обмена Ras вступает в межбелковое взаимодействие с SOS с образованием комплекса, содержащего одну SOS и две молекулы Ras. SOS является уникальным среди Ras-специфических GEF в том, что он имеет аллостерический Ras-связывающий сайт, который увеличивает его каталитическую активность. Кристаллическая структура комплекса основного каталитического домена (SOS^{cat}) показывает, что H-Ras расположен в участке Cdc25 домена SOS^{cat} и включен в комплекс фрагментом, отвечающим за обмен нуклеотидов. При присоединении SOS происходят значительные конформационные изменения в структуре Ras, что приводит к открытию его сайта связывания нуклеотидов (рис. 4) [58]. SOS стабилизирует свободную от нуклеотидов форму Ras путем формирования комплекса и приводит к открытию активного сайта Ras с высвобождением нуклеотида, переводя Ras в активную форму. Аллостерическое связывание Ras-GTP стабилизирует белок SOS на мембране, где он может катализировать другие молекулы Ras, приводя к сверхчувствительному ответу, отличному от ответа других Ras-специфических GEF [59].

Несколькими группами исследователей с использованием скрининга на основе фрагментов известных лигандов были определены эффективные структуры, ответственные за взаимодействия с сайтами комплекса Ras-SOS [60–62] (рис. 5), и синтезирован ряд оптимизированных соединений, связывающихся с комплексом Ras-SOS.

Эти соединения можно разделить на несколько классов (рис. 5): производные сахаров (соединение SCH-54292 и его аналоги), производные индо-

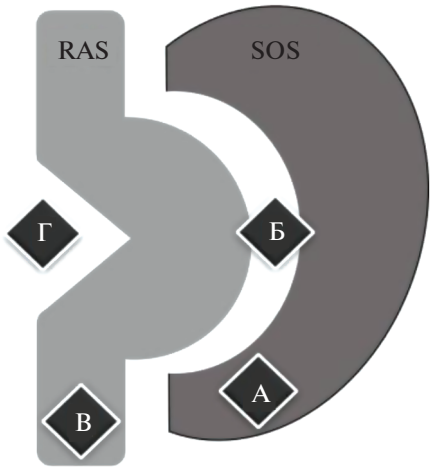


Рис. 4. Комплекс Ras-SOS. А – сайт связывания белка SOS, Б – сайт связывания, сформированный совместно белками Ras и SOS, В – сайт связывания SOS в Ras-белке, Г – сайт связывания нуклеотидов в Ras-белке.

ла и сульфонамида, производные андрографолида и его бензилиденовые производные (соединения AGP, SRJ09, SRJ23) [61]. Было показано, что соединение SCH-54292 и его аналоги способны ингибировать активацию Ras с IC_{50} на микромолярном уровне [63, 64].

Как было показано в экспериментах *in vitro*, соединения AGP, SRJ09, SRJ23, связываясь с сайтами белка KRas4B, стабилизируют комплекс Ras-SOS, не позволяя проходить SOS-катализируемому обмену нуклеотидов и переводу Ras-белка в активную форму [65]. В совокупности эти результаты показывают, что исследованные соединения могут ингибировать процесс нуклеотидного обмена мутированных белков Ras и предлагают новый способ ингибирования SOS-опосредованной активации Ras, что открывает потенциальный путь для предотвращения развития и роста опухоли [66].

Однако, хотя эти соединения и способны влиять на нуклеотидный обмен между активной и неактивной формами белка Ras, по-видимому, для успешного применения требуются соединения, обладающие большей аффинностью. Возможно, более эффективным решением будет получение гибридных молекул, содержащих фармакофоры, соединенные рассчитанной длины линкерами, связывающихся с несколькими сайтами комплекса Ras-SOS.

Фарнезилтрансфераза (FT-аза) и ее ингибиторы

На протяжении последних 20–30 лет наиболее традиционной молекулярной мишенью потенциальных противоопухолевых препаратов остается фермент FT-аза [49].

Для посттрансляционного процессинга белков Ras FT-азы, наряду с GGT-азой-1, играют ключевую роль и обеспечивают активацию белков семейств Ras и RhoB [67, 68]. Эти ферменты локализованы в цитозоле, катализируют пренилирование белков и различаются белковыми мишенями и присоединяемым изопреноидным субстратом [69].

FT-аза катализирует присоединение 15-углеродного фрагмента фарнезилдифосфата [69] к белкам, содержащим CAAX-фрагмент (рис. 2). FT-аза представляет собой гетеродимер двух субъединиц, α и β, с молекулярной массой 48 и 46 кДа, соответственно [71, 72]. Активные центры фермента формируются пересечением центра β-субъединицы с частями α-субъединицы. FT-аза содержит в своем активном центре двухвалентный цинк (Zn^{2+}) для связывания с фрагментом CAAX [73], для катализа требует наличия иона магния (Mg^{2+}) [70]. Субстратная специфичность FT-аз определяется аминокислотными остатками участка CAAX, в частности аминокислотным остатком X [74]. Белки, содержащие в качестве X метионин или серин, проявляют большую аффинность к FT-азе. Это белки N-Ras, содержащие фрагмент Cys-Val-Val-Met, K-Ras4A с Cys-Ile-Ile-Met, K-Ras4B с Cys-Val-Ile-Met, и H-Ras с Cys-Val-Leu-Ser, причем аф-

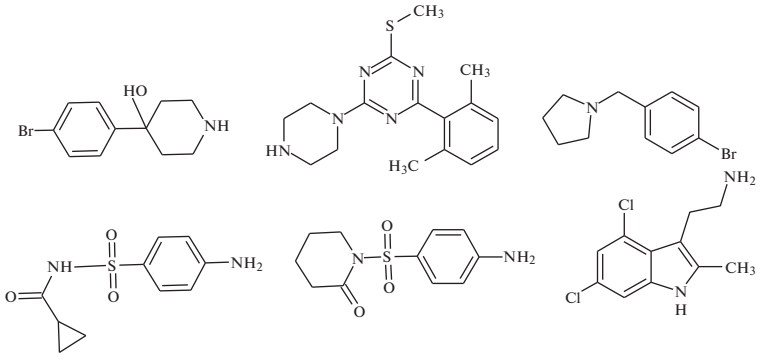


Рис. 5. Приведены структуры фрагментов эффективных лигандов комплекса Ras-SOS.

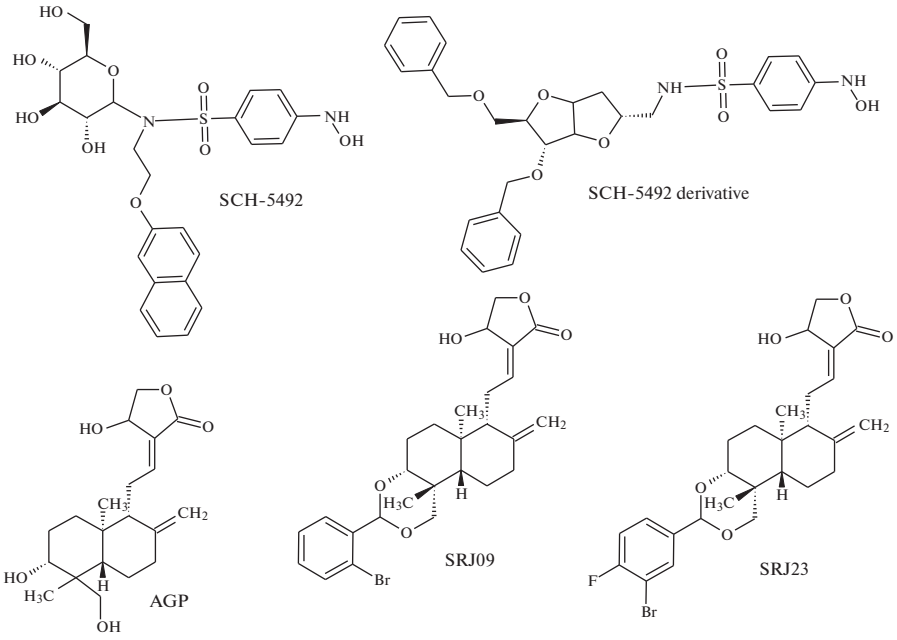


Рис. 6. Структуры оптимизированных соединений, связывающихся с комплексом Ras-SOS.

финность белков, содержащих метионин, в 30 раз превышает аффинность белков, содержащих серин или глицин [69, 75, 76]. Важно отметить, что FT-аза содержит места связывания как для CAAX-содержащего пептида, так и для фарнезилдифосфата (FDP) [77–79]. Сайты связывания FDP и CAAX расположены в β-субъединице, в то время как α-субъединица стабилизирует β-субъединицу и катализирует передачу фарнезила [77]. α-Субъединица после передачи фарнезила фосфорилируется, восстанавливая активность фермента [78].

GGT-аза-1, также как и FT-аза, состоит из α- и β-субъединиц. α-Субъединица обоих ферментов имеет одинаковую молекулярную массу – 48 кДа, и одинаковое строение [79]. β-Субъединицы этих ферментов различны, идентичность аминокислотных последовательностей составляет около 30% [80]. Оба фермента, FT-аза и GGT-аза-1 в соответствии со своими функциями имеют два субстрата – изопреноид и белок (Ras) [81].

Ион цинка находится в активном центре и необходим для проявления энзиматической активности. Он координируется тремя аминокислотными остатками (Aspb297, Cysb299 и Hisb362 в β-субъединице FT-азы; и Aspb269, Cysb271 и Hisb321 в GGT-азе-I [58, 71, 82].

В организме человека к настоящему времени идентифицировано много белков, содержащих CAAX-фрагмент: Ras, Rho, Rac, Rap [83–85]. Белки семейства Ras считаются первыми идентифицированными субстратами FT-азы. Однако было обнаружено, что в присутствии ингибиторов фарнезилтрансферазы белки N-Ras и K-Ras могут пренилироваться геранилгеранилтрансферазой-1 и только H-Ras фарнезилируется [86, 87]. Это приводит к необходимости одновременного использования ингибиторов обоих ферментов, и является одним из направлений разработки противоопухолевых препаратов.

С момента открытия онкобелков Ras и FT-азы активно использовался подход по созданию препаратов, блокирующих фарнезилирование, – ингибиторов FT-азы, – конкурирующих с FPP или CAAX-содержащим субстратом. В результате имеется огромное количество литературных данных об исследованиях *in vitro*, в которых показана эффективность ингибиторов FT-азы при H-Ras-опосредованной клеточной трансформации [87–89]. Эта стратегия долгое время была основной в разработке ингибиторов FT-азы. К настоящему времени синтезировано большое количество таких соединений [27, 36, 91, 92].

Ингибиторы FT-азы и GGT-азы-I можно разделить на четыре класса: 1) небольшие молекулы, конкурирующие с изопреноидным субстратом, 2) небольшие молекулы, конкурирующие с белковым субстратом (CAAX-содержащим), 3) бисубстратные аналоги, 4) соединения, не конкурирующие ни с белковым, ни с изопреноидным субстратом [91, 93, 94] (рис. 7).

Ингибиторы FT-азы исследуются или были исследованы на разных фазах клинических испытаний. Это, прежде всего, такие препараты, как лонафарниб (Schering-Plough), типифарниб (Ortho Biotech Products), L778123 (Merck), BMS-214662 (Bristol-Myers). Высокая активность *in vitro* и спе-

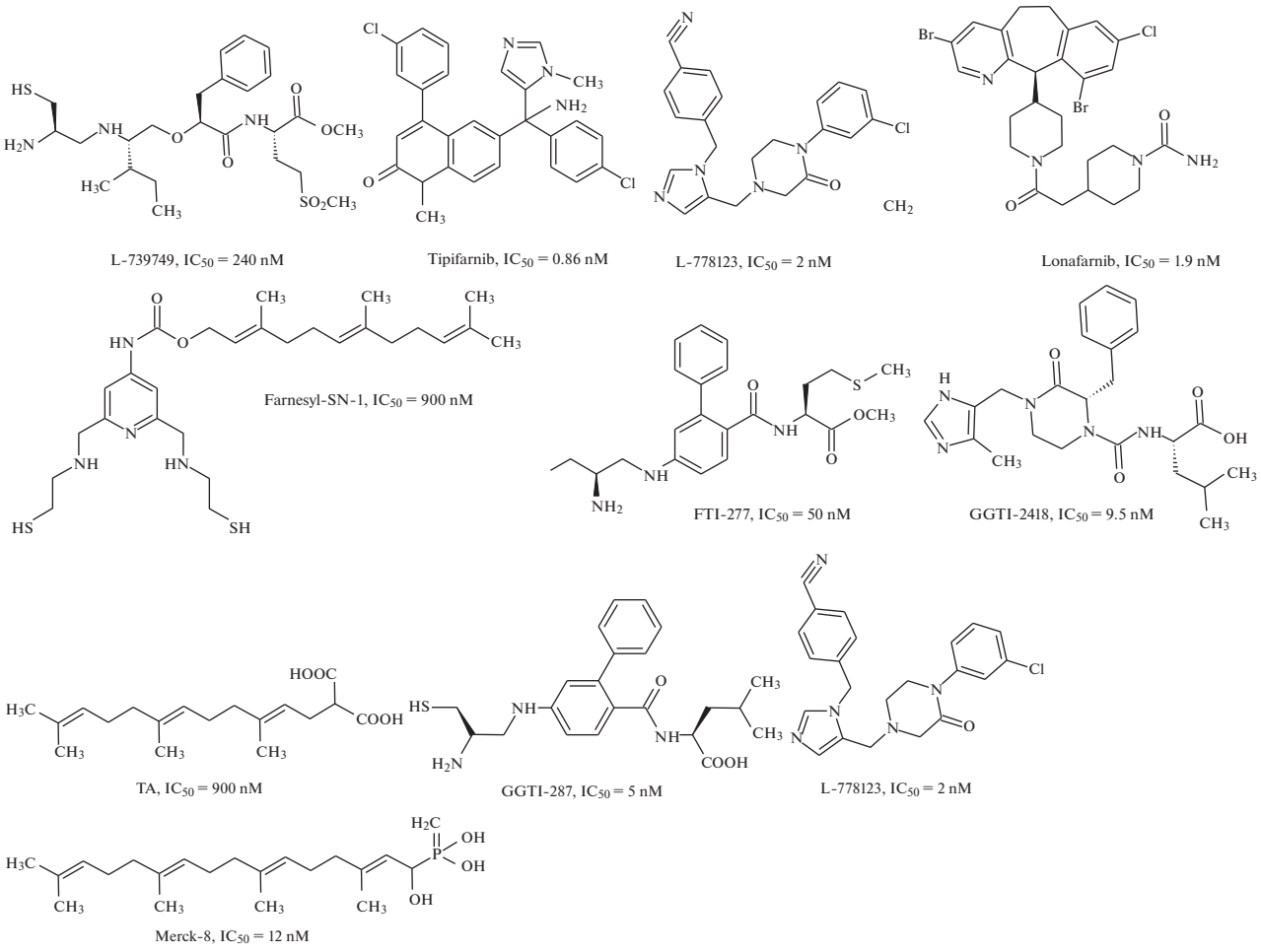


Рис. 7. Ингибиторы фарнезилтрансферазы и их ингибирующая активность.

цифические функции ингибиторов FT-азы обеспечили их интенсивное исследование на 1-й фазе клинических испытаний. Было показано, что их цитотоксические эффекты достигались в концентрациях много ниже токсических для нормальных тканей [95]. Однако клинические исследования фаз 2–3, которые являются критическими для выбора специфических опухолей и определяют дальнейшую судьбу препаратов, показали далеко не обнадеживающие результаты [96, 97].

Неутешительные результаты клинических исследований FTI привели к некоторому забвению этой терапевтической области. Тем не менее, несмотря на отсутствие эффективности против опухолей, экспрессирующих K-Ras, FTI являются мощными супрессорами H-Ras и в настоящее время испытываются в клинических исследованиях на пациентах с онкогенными мутациями H-Ras [98].

Одновременно с этим развиваются и новые подходы к использованию ингибиторов FT-азы, основанные на более глубоком понимании механизмов их действия. Основной проблемой при создании эффективных в клинике ингибиторов FT-азы является тот факт, что белки Ras являются GTP-азами, регуляция которых происходит за счет цикла присоединения GTP (активация, этот процесс стимулируется GEFs) и гидролиза GTP до GDP для дезактивации (стимулируется GAPs) (рис. 1). В результате прямого ингибирования FT-азы происходит накопление GTP-связанного Ras, что может приводить к негативным последствиям [99].

Еще одной серьезной проблемой разработки ингибиторов Ras является высокая аффинность связывания белков Ras с GTP – этот процесс происходит на пикомолярном уровне, тогда как для многих протеинкиназ такое связывание отмечается на микромолярном уровне [100]. Наличие этого феномена приводит к тому, что синтезированные аналоги нуклеотидов активно блокируют связывание ATP с киназами, но не способны блокировать связывание GTP с Ras [101].

Белки Ras для корректного встраивания в мембрану и активации требуют фарнезилирования. Однако в присутствии ингибиторов FT-азы белки

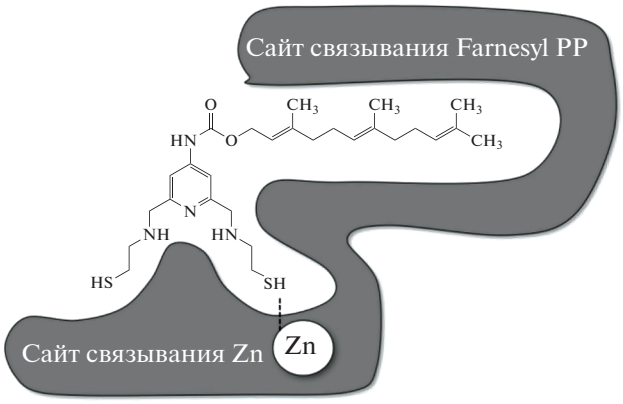


Рис. 8. Позиционирование соединения Farnesyl-SN-1 в сайте связывания Zn^{2+} и фарнезилпирофосфата [94].

K-Ras и N-Ras могут быть геранилгеранилированы GGTase-I [87, 102]. В соответствии с этим перспективным направлением разработки ингибиторов Ras является синтез гибридных молекул, одновременно ингибирующих FT-азу и GGT-азу-I. Наиболее известным представителем этого класса соединений является L-778123 (рис. 7), который в наномолярных концентрациях ингибирует пренилирование H-Ras, N-Ras и K-Ras [103] и в настоящий момент препарат проходит клинические испытания.

Интересным подходом представляется создание ингибиторов FT-азы, блокирующих возможность не только фарнезилирования, но и дальнейшего пренилирования CAAX-мотива [99]. Предыдущие поколения ингибиторов были нацелены на ингибирование функции самой FT-азой, оставляя мотив CAAX доступным для пренилирования GGT-азы, что является достаточным для последующей мембранной локализации Ras. Было показано, что с использованием нео-субстратной стратегии возможно устранить этот недостаток. Был разработан альтернативный субстрат для FT-азы, который ковалентно модифицировал концевой цистеин белка K-Ras. Это приводило не только к невозможности альтернативного (GGT-азой) пренилирования, но и к нарушению локализации K-Ras в клетке. Известно, что существенным фактором для малигнизации опухоли является необходимость присутствия не только мутированных форм онкобелков Ras, но и не подвергнувшихся мутации и функционирующих. Так, например, онкогенная активность K-Ras требует наличия функционирующих белков H-Ras или N-Ras [25, 26]. В результате применения нео-субстратной стратегии получается не только ингибирование нормального фарнезилирования и альтернативного пренилирования, но и накопление Ras белка в несвойственном ему месте – в цитоплазме, что повышает эффективность действия препаратов [99].

Перспективным направлением поиска ингибиторов FT-азы является применение бисубстратной стратегии. При этом в одной молекуле объединяются фрагменты, отвечающие за взаимодействие с несколькими сайтами связывания. Так, например, в работе [104] созданы новые ингибиторы FT-азы, содержащие фрагмент, связывающий ион цинка активного центра и фарнезильную группу для более точного позиционирования – например, соединение Farnesyl-SN-1 (рис. 7, 8). Полученные соединения проявляют выраженную ингибирующую активность в отношении FT-азы и обладают цитотоксичностью для ряда опухолевых клеток.

Следует отметить, что когда было выяснено, что мутантные формы Ras являются движущей силой образования многих видов злокачественных опухолей человека, огромные усилия и ресурсы были направлены на то, чтобы разработать их ингибиторы. К сожалению, это они не нашли успешного применения в клинике. При дальнейших исследованиях выяснилось, что функции онкобелков Ras и FT-азы более обширны и разнообразны [105]. Понимание тонких механизмов регуляции процессинга онкобелков Ras и их взаимосвязи с процессом малигнизации опухоли, а также использование новых стратегий создания лекарственных препаратов, основанных как на регуляции локализации онкобелков Ras, так и на применении новых, бифармакофорных соединений, позволяют надеяться на возрождение интереса к разработке противоопухолевых лекарственных препаратов на основе ингибиторов FT-аз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мутантные формы Ras являются причиной образования многих видов злокачественных опухолей человека. Регулируемые ими сигнальные пути, такие, как сигнальные пути Raf/MEK/ERK и фосфоинозитид-3-киназы, регулируют важнейшие свойства малигнантных клеток – рост и выживание, пролиферацию, дифференциацию, адгезию, способность избегать апоптоза. Понимание тонких механизмов регуляции процессинга онкобелков Ras и их взаимосвязи с процессом малигнизации опухоли, а также использование новых стратегий, основанных как на регуляции локализации онкобелков Ras в клетке, так и на применении новых, бифармакофорных соединений, действующих на разные сайты связывания фермента, позволяют надеяться на возрождение интереса к ингибиторам FT-азы, как потенциальным антинеопластам.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-33-20209, анализ структур ингибиторов фарнезилтрансферазы выполнен в рамках Госзадания 0090-2019-0006.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jiang K., Coppola D., Crespo N.C., Nicosia S.V., Hamilton A.D., Sebti S.M., Cheng J.Q.* // Mol. Cell. Biol. 2000. V. 20. P. 139–148. https://doi.org/10.1128/mcb.20.1.139-148.2000
2. *Bos J.L.* // Cancer Res. 1989. V. 49. P. 4682–4689.
3. *Barbacid M.* // Annu. Rev. Biochem. 1987. V. 56. P. 779–827.
4. *Samatar A.A., Poulikakos P.I.* // Nat. Rev. Drug Discov. 2014. V. 13. P. 928–942. https://doi.org/10.1038/nrd4281
5. *Pylayeva-Gupta Y., Grabocka E., Bar-Sagi D.* // Nat. Rev. Cancer. 2011. V. 11. P. 761–774. https://doi.org/10.1038/nrc3106
6. *Baines A.T., Xu D., Der C.J.* // Future Med. Chem. 2011. V. 3. P. 1787–1808. https://doi.org/10.4155/fmc.11.121
7. *Wang J., Yao X., Huang J.* // Med. Chem. Comm. 2017. V. 8. P. 841–854. https://doi.org/10.1039/c7md00030h
8. *Kranenburg O., Gebbink M., Voest E.* // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1654. P. 23–37. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2003.09.004
9. *Jung F.* // Circ. Res. 2002. V. 91. P. 38–45.
10. *Blancher C., Moore J.W., Robertson N., Harris A.L.* // Cancer Res. 2001. V. 61. P. 7349–7355.
11. *Rak J., Mitsuhashi Y., Sheehan C., Tamir A., Viloria-Petit A., Filmus J., Mansour S.J., Ahn N.G., Kerbel R.S.* // Cancer Res. 2000. V. 60. P. 490–498.
12. *Sharma V., Shaheen S.S., Dixit D., Sen E.* // Inflammation. 2012. V. 35. P. 516–519. https://doi.org/10.1007/s00109-010-0683-5
13. *Tsujii M., Kawano S., Tsuji S., Sawaoka H., Hori M., DuBois R.N.* // Cell. 1998. V. 93. P. 705–716. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81433-6
14. *Rojas A.M., Fuentes G., Rausell A., Valencia A.* // Cell Biol. 2012. V. 196. P. 189–201. https://doi.org/10.1083/jcb.201103008
15. *Marín-Ramos N.I., Ortega-Gutiérrez S., López-Rodríguez M.L.* // Semin Cancer Biol. 2019. V. 54. P. 91–100. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.01.017
16. *Mitin N., Rossman K.L., Der C.J.* // Curr. Biol. CB. 2005. V. 15. P. 563–574. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.010
17. *Vasan N., Boyer J.L., Herbst R.S.* // Clin. Cancer Res. 2014. V. 2. P. 3921–3930. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1762
18. *Rodriguez-Viciana P., Warne P.H., Dhand R., Vanhaesebroeck B., Gout I., Fry M.J., Waterfield M.D., Downward J.* // Nature. 1994. V. 370. P. 527–532. https://doi.org/10.1038/370527a0
19. *Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.* // Molecular Cell Biology (4th ed.). 2000.
20. *Vivanco I., Sawyers C.L.* // Nature Review Cancer. 2002. V. 2. P. 489–501. https://doi.org/10.1038/nrc839
21. *Sever R., Brugge J.S.* // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2015. V. 5. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006098
22. *Bourne H.R., Sanders D.A., McCormick F.* // Nature. 1990. V. 348. P. 125–132. https://doi.org/10.1038/348125a0
23. *Bos J.L., Rehmann H., Wittinghofer* // Cell. 2007. V. 129. P. 865–877. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.018
24. *Brock E.J., Ji K., Reiners J.J., Mattingly R.R.* // Mini Rev. Med. Chem. 2016. V. 16. P. 358–369. https://doi.org/10.2174/1389557515666151001154002
25. *Lim K.H., Ancrile B.B., Kashatus D.F., Counter C.M.* // Nature. 2008. V. 452. P. 646–649. https://doi.org/10.1038/nature06778
26. *Bentley C., Jurinka S.S., Kljavin N.M., Vartanian S., Ramani S.R., Gonzalez L.C., Yu K., Modrusan Z., Du P., Bourgon R., Neve R.M., Stokoe D.* // Biochem. 2013. V. 452. P. 313–320. https://doi.org/10.1042/BJ20121578
27. *Agrawal A.G., Somani R.R.* // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2009. V. 9. P. 638–652. https://doi.org/10.2174/138955709788452702
28. *Klochkov S.G., Neganova M.E., Yarla N.S., Parvathaneni M., Sharma B., Tarasov V.V., Barreto G., Bachurin S.O., Ashraf G.M., Aliev G.* // Semin. Cancer. Biol. 2019. V. 56. P. 128–134. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.10.010
29. *McCormick F.* // Nature. 1993. V. 363. P. 15–16. https://doi.org/10.1038/363015a0
30. *McCormack F.* // Curr. Opin. Genet. Dev. 1994. V. 4. P. 71–76. https://doi.org/10.1016/0959-437x(94)90093-0
31. *Kato K., Cox A.D., Hisaka M.M., Graham S.M., Bus J.E., Der C.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 1992. V. 89. P. 6403–6407. https://doi.org/10.1073/pnas.89.14.6403
32. *Casey P.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 1989. V. 86. P. 8323–8327. https://doi.org/10.1073/pnas.86.21.8323
33. *Gelb M.H.* // Science. 1997. V. 275. P. 1750–1751. https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1750
34. *Cox A.D., Der C.J.* // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1333. P. 51–71. https://doi.org/10.1016/s0304-419x(97)00011-5

35. *Omer C.A., Anthony N.J., Buser-Doepner C.A., Burkhardt A.L., deSolms S.J., Dinsmore C.J., Gibbs J.B., Hartman G.D., Koblan K.S., Lobell R.B., Oliff A., Williams T.M., Kohl N.E.* // Biofactors. 1997. V. 6. P. 359–366. https://doi.org/10.1002/biof.5520060306
36. *Gibbs J.B., Oliff A.* // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1997. V. 37. P. 143–166. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.37.1.143
37. *Schafer W.R., Kim R., Sterne R., Thorner J., Kim S., Rine J.* // Science. 1989. V. 245. P. 379–385. https://doi.org/10.1126/science.2569235
38. *Gibbs J.B.* // Springer-Verlag. 1993. V. 137.
39. *Clarke S., Vogel J.P., Deschenes R.J., Stock J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 1988. V. 85. P. 4843–4847. https://doi.org/10.1073/pnas.85.13.4643
40. *Fujita-Yamaguchi Y., Kathuria S., Xu Q-Y., McDonald J.M., Nakano H., Kamata T.* // Proc. Nab. Acad. Sci. 1989. V. 86. P. 7306–7310.
41. *Hancock J.F., Magee A.I., Childs J.E., Marshall C.* // Cell. 1989. V. 57. P. 1167–1177. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90054-8
42. *Casey P.J., Solski P.A., Der C.J., Buss J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 1989. V. 86. P. 1167–1177. https://doi.org/10.1073/pnas.86.21.8323
43. *Gutierrez L., Magee A.I., Marshall C. J., Hancock J.F.* // EMBO. 1989. V. 8. P. 1093–1098.
44. *Hancock J.F., Paterson H., Marshall C.J.* // Cell. 1990. V. 63. P. 133–139. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90294-o
45. *Casey P.J., Seabra M.C.* // Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 5289–5292. https://doi.org/10.1074/jbc.271.10.5289
46. *James G.L., Goldstein J.L., Brown M.S.* // Biol. Chem. 1995. V. 266. P. 14603–14610. https://doi.org/10.1074/jbc.270.11.6221
47. *Armstrong S.A., Hannah V.C., Goldstein J.L., Brown M.S.* // Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 7864–7868. https://doi.org/10.1074/jbc.270.14.7864
48. *Marks R.E., Ho A.W., Robbel C., Kuna T., Berk S., Gajewski T.F.* // Blood. 2007. V. 110. P. 1982–1988. https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-031088
49. *Khan A.Q., Kuttikrishnan S., Siveen K.S., Prabhu K.S., Shanmugakonar M., Al-Naemi H.A., Haris M., Dermime S., Uddin S.* // Seminars in Cancer Biology. 2018. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.03.001
50. *Spencer-Smith R., O'Bryan J.P.* // Seminars in Cancer Biology. 2017. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.12.005
51. *Vigil D., Cherfils J., Rossman K.L., Der C.J.* // Nat. Rev. Cancer. 2010. V. 10. P. 842–857. https://doi.org/10.1038/nrc2960
52. *Ahearn I.M., Haigis K., Bar-Sagi D., Philips M.R.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2012. V. 13. P. 39–51. https://doi.org/10.1038/nrm3255
53. *Adjei A.A.* // Natl. Cancer Inst. 2001. V. 93. P. 1062–1074. https://doi.org/10.1093/jnci/93.14.1062
54. *Schubbert S., Shannon K., Bollag G.* // Nat. Rev. Cancer. 2007. V. 7. P. 295–308. https://doi.org/10.1038/nrc2109
55. *Noonan T., Brown N., Dudycz L., Wright G.* // Med. Chem. 1991. V. 34. P. 1302–1307. https://doi.org/10.1021/jm00108a010
56. *Wolin R., Wang D., Kelly J., Afonso A., James L., Kirschmeier P., McPhail A.T.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1996. V. 6. P. 195–200. https://doi.org/10.1016/0960-894X(95)00574-D
57. *Wilson C.Y., Tolias P.* // Drug Discov. Today. 2016. V. 21. P. 1915–1919. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.08.002
58. *Boriack-Sjodin P.A., Margarit S.M., Bar-Sagi D., Kuriyan J.* // Nature. 1998. V. 394. P. 337–343. https://doi.org/10.1038/28548
59. *Bandaru P., Kondo Y., Kuriyan J.* // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2019. V. 9. P. a031534. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031534
60. *Maurer T., Garrenton L.S., Oh A., Pitts K., Anderson D.J., Skelton N.J., Fauber B.P., Pan B., Malek S., Stokoe D., Ludlam M.J., Bowman K.K., Wu J., Giannetti A.M., Starovasnik M.A., Mellman I., Jackson P.K., Rudolph J., Wang W., Fang G.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 5299–5304. https://doi.org/10.1073/pnas.1116510109
61. *Sun Q., Burke J.P., Phan J., Burns M.C., Olejniczak E.T., Waterson A.G., Lee T., Rossanese O.W., Fesik S.W.* // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2012. V. 51. P. 6140–6143. https://doi.org/10.1002/anie.201201358
62. *Winter J.J., Anderson M., Blades K., Brassington C., Breeze A.L., Chresta C., Embrey K., Fairley G., Faulder P., Finlay M.R., Kettle J.G., Nowak T., Overman R., Patel S.J., Perkins P., Spadola L., Tart J., Tucker J.A., Wrigley G.* // Med. Chem. 2015. V. 58. P. 2265–2274. https://doi.org/10.1021/jm501660t
63. *Ganguly A.K., Pramanik B.N., Huang E.C., Liberles S., Heimark L., Liu Y.H., Tsarbopoulos A., Doll R.J., TaveRas A.G., Remiszewski S., Snow M.E., Wang Y.S., Vibulbhan B., Cesarz D., Brown J.E., del Rosario J., James L., Kirschmeier P., Girijavallabhan V.* // Bioorg. Med. Chem. 1997. V. 5. P. 817–820. https://doi.org/10.1016/s0968-0896(97)00021-7
64. *Taveras A.G., Remiszewski S.W., Doll R.J., Cesarz D., Huang E.C., Kirschmeier P., Pramanik B.N., Snow M.E., Wang Y.S., del Rosario J.D., Vibulbhan B., Bauer B.B., Brown J.E., Carr D., Catino J., Evans C.A., Girijavallabhan V., Heimark L., James L., Liberles S., Nash C., Perkins L., Senior M.M., Tsarbopoulos A., Webber S.E.* // Bioorg. Med. Chem. 1997. V. 5. P. 125–133. https://doi.org/10.1016/S0968-0896(96)00202-7
65. *Hocker H.J., Cho K.-J., Chen C.-Y.K., Rambahal N., Sagineedu S.R., Shaari K., Stanslas J., Hancock J.F., Gorfe A.A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 10201–10206. https://doi.org/10.1073/pnas.1300016110
66. *Lu S., Jang H., Zhang J., Nussinov R.* // Chem. Med. Chem. 2016. V. 11. P. 814–821. https://doi.org/10.1038/srep21949
67. *Delarue F.L., Adnane J., Joshi B., Blaskovich M.A., Wang D.A., Hawker J., Bizouarn F., Ohkanda J., Zhu K., Hamilton A.D., Chellappan S., Sebti S.M.* // Oncogene. 2007. V. 26. P. 633–640. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209819
68. *Fritz G., Kaina B.* // Curr. Cancer Drug Targets. 2006. V. 6. P. 1–14.

69. *Shen M., Pan P., Li Y., Li D., Yu H., Hou T.* // Drug Discov. Today. 2015. V. 20. P. 267–276. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.002
70. *Subramanian T., Liu S., Troutman J.M., Andres D.A., Spielmann H.P.* // Chembiochem. 2008. V. 9. P. 2872–2882. https://doi.org/10.1002/cbic.200800248
71. *Zhang F.L., Casey P.J.* // Ann. Rev. Biochem. 1996. V. 65. P. 241–269. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.001325
72. *Dunten P., Kammlott U., Crowther R., Weber D., Palermo R., Birktoft J.* // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 7907–7912. https://doi.org/10.1021/bi980531o
73. *Sousa S.F., Fernandes P.A., Ramos M.J.* // Curr. Med. Chem. 2008. V. 15. P. 1478–1492. https://doi.org/10.2174/092986708784638825
74. *Moores S.L., Schaber M.D., Mosser S.D., Rands E., O'Hara M.B., Garsky V.M., Marshall M.S., Pompliano D.L., Gibbs J.B.* // Biol. Chem. 1990. V. 266. P. 14603–14610.
75. *Reiss Y., Goldstein J.L., Seabra M.C., Casey P.J., Brown M.S.* // Cell. 1990. V. 62. P. 81–88.
76. *Reiss Y., Stradley S.J., GieRasch L.M., Brown M.S., Goldstein J.L.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 1991. V. 88. P. 732–36. https://doi.org/10.1073/pnas.88.3.732
77. *Andres D.A., Goldstein J.L., Ho Y.K., Brown M.S.* // Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 1383–1390.
78. *Kumar A., Beresini M.H., Dhawan P., Mehta K.D.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. V. 222. P. 445–452. https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0764
79. *Seabra M.C., Reiss Y., Casey P.J., Brown M.S., Goldstein J.L.* // Cell. 1991. V. 65. P. 429–434. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90460-g
80. *Long S.B., Casey P.J., Beese L.S.* // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 9612–9618. https://doi.org/10.1021/bi980708e
81. *Park H.W., Boduluri S.R., Moomaw J.F., Casey P.J., Beese L.S.* // Science. 1997. V. 275. P. 1800–2180. https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1800
82. *Fu H.W., Beese L.S., Casey P.J.* // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 4465–4472. https://doi.org/10.1021/bi972511c
83. *Kinsella B.T., Erdman R.A., Maltese W.A.* // Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 9786–9794.
84. *Nobes C.D., Lauritzen I., Mattei M.G., Paris S., Hall A., Chardin P.* // Cell Biol. 1998. V. 141. P. 187–197. https://doi.org/10.1083/jcb.141.1.187
85. *Kontani K., Tada M., Ogawa T., Okai T., Saito K., Araki Y., Katada T.* // Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 41070–41078. https://doi.org/10.1074/jbc.M202150200
86. *Whyte D.B., Kirschmeier P., Hockenberry T.N., Nunez-Oliva I., James L., Catino J.J., Bishop W.R., Pai J.K.* // Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 14459–14464. https://doi.org/10.1074/jbc.272.22.14459
87. *Zhang F.L., Kirschmeier P., Carr D., James L., Bond R.W., Wang L., Patton R., Windsor W.T., Syto R., Zhang R., Bishop W.R.* // Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 10232–10239. https://doi.org/10.1074/jbc.272.15.10232
88. *Nagasu T., Yoshimatsu K., Rowell C., Lewis M.D., Garcia A.M.* // Cancer Res. 1995. V. 55. P. 5310–5314.
89. *Sun J., Qian Y., Hamilton A.D., Sebti S.M.* // Oncogene. 1998. V. 16. P. 1467–1473. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201656
90. *Brunner T.B., Hahn S.M., Gupta A.K., Muschel R.J., McKenna W.G., Bernhard E.J.* // Cancer Res. 2003. V. 63. P. 5656–5668.
91. *Strickland C.L., Weber P.C., Windsor W.T., Wu Z., Le H.V., Albanese M.M., Alvarez C.S., Cesarz D., del Rosario J., Deskus J., Mallams A.K., Njoroge F.G., Piwinski J.J., Remiszewski S., Rossman R.R., TaveRas A.G., Vibulbhan B., Doll R.J., Girijavallabhan V.M., Ganguly A.K.* // Med. Chem. 1999. V. 42. P. 2125–2135. https://doi.org/10.1021/jm990030g
92. *Клочков С.Г., Афанасьева С.В., Зефиров Н.С.* // Технологии живых систем. 2008. С. 31–39.
93. *Crul M., de Klerk G.J., Beijnen J.H, Schellens J.H.* // Anticancer Drugs. 2001. V. 12. P. 163–184. https://doi.org/10.1097/00001813-200103000-00001
94. *Reid T.S., Long S.B., Beese L.S.* // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 9000–9008. https://doi.org/10.1021/bi049280b
95. *Midgley R.S., Kerr D.J.* // Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2002. V. 44. P. 109–120. https://doi.org/10.1016/s1040-8428(01)00189-5
96. *Gordon L.B., Kleinman M.E., Massaro J., D'Agostino R.B. Sr., Shappell H., Gerhard-Herman M., Smoot L.B., Gordon C.M., Cleveland R.H., Nazarian A., Snyder B.D., Ullrich N.J, Silvera V.M., Liang M.G., Quinn N., Miller D.T., Huh S.Y., Dowton A.A., Littlefield K., Greer M.M., Kieran M.W.* // Circulation. 2016. V. 134. P. 114–125. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022188
97. *Jabbour E., Kantarjian H., Cortes J.* // Expert Opin. Investig. Drugs. 2007. V. 16. P. 381–392. https://doi.org/10.1517/13543784.16.3.381
98. *Chen X., Makarewicz J.M., Knauf J.A., Johnson L.K., Fagin J.A.* // Oncogene. 2013. V. 33. P. 5442–5449. https://doi.org/10.1038/onc.2013.489
99. *Novotny C.J., Hamilton G.L., McCormick F., Shokat K.M.* // ACS Chem. Biol. 2017. https://doi.org/10.1021/acschembio.7b00374
100. *John J., Rensland H., Schlichting I., Vetter I., BoRasio G.D., Goody R.S., Wittinghofer A.* // Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 923–929.
101. *Goekjian P.G.* // Curr. Med. Chem. 1999. V. 6. P. 877–903.
102. *Fu H.W., Casey P.J.* // Rec. Prog. Hormone Res. 1999. V. 54. P. 315–342.
103. *Morgan M.A., Onono F.O., Spielmann H.P., Subramanian T., Scherr M., Venturini L., Dallmann I., Ganser A., Reuter C.W.* // Mol. Med. 2012. V. 90. P. 149–161. https://doi.org/10.1007/s00109-011-0814-7
104. *Tanaka A., Radwan M.O., Hamasaki A., Ejima A., Obata E., Koga R., Tateishi H., Okamoto Y., Fujita M., Nakao M., Umezawa K., Tamanoi F., Otsuka M.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017. V. 27. P. 3862–3866. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.06.047
105. *Cox A.D., Der C.J.* // Oncogene. 2003. V. 22. P. 8999–9006. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207111

Promising Molecular Targets for Creation of Antitumor Drugs Based on Ras Proteins Signaling Cascades

S. G. Klochkov*, #, M. E. Neganova*, and Yu. R. Aleksandrova*

#Phone: +7 (496) 524-25-25; e-mail: klochkov@ipac.ac.ru

**The Institute of Physiologically Active Compounds of Russian Academy of Sciences, Severniy proezd 1, Moscow region, Chernogolovka, 142432 Russia*

Oncological diseases have always been among the most significant pathologies. Therefore, the development of effective antitumor drugs is considered one of the priorities of Modern Healthcare. Inhibitors of proteins, enzymes, receptors that regulate the signaling pathways of tumor cells, and inducers of apoptosis are used for tumor chemotherapy. The most significant and studied signaling pathways are the Raf/MEK/ERK and phosphoinositide-3 kinase (PI3K). Changes in the cascades of these pathways lead to the modulation of many cellular functions, such as cell growth and survival, proliferation, differentiation and adhesion. These signaling cascades are closely related to Ras proteins. Oncogenic forms of Ras proteins are detected in a large number of tumor diseases – more than 30% of all forms of neoplasms. The literature data for the last 30 years on the study of the key stages of signaling cascades initiated by oncogenic Ras proteins are considered in this review. The processing features of Ras proteins, which are currently considered as promising molecular targets for the development of antitumor drugs, are analyzed separately. Literature data on new strategies for searching of effective antineoplasts, which are based on Ras proteins signaling pathways and bifarmacophore compounds are presented and discussed.

Keywords: oncogenic Ras proteins, processing, farnesyltransfee, antitumor drugs

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 593–665

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.181.3

АНТИБИОТИКИ ИЗ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ[1]

© 2020 г. А. А. Баранова*, В. А. Алферова*, *, В. А. Коршун*, **, ***, А. П. Тюрин*, ***, #**

**Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11/1*

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

****НИУ "Высшая школа экономики", Россия, 101000 Москва, ул. Мясницкая, 20*

Поступила в редакцию 30.04.2020 г.
После доработки 08.05.2020 г.
Принята к публикации 12.05.2020 г.

Экстремофильные микроорганизмы, т.е. способные нормально функционировать при экстремально высоких или низких температурах, давлении и др. условиях внешней среды, уже несколько десятилетий находятся в фокусе внимания микробиологов из-за биотехнологического потенциала их ферментов. Последние (называемые также экстремозимами) нашли применение в производстве продуктов питания, моющих средств и других отраслях промышленности. При этом обитатели экстремальных экониш долгое время оставались практически неизученными с точки зрения химии природных соединений. В последние годы глобальной проблемой является появление все новых антибиотикорезистентных штаммов патогенов, поражающих человека и животных. Проблема усугубляется сильным снижением темпов разработки новых антибиотиков. В поисках новых активных веществ и скаффолдов для медицинской химии исследователи обращаются к малоисследованным природным источникам: в последнее время наблюдается резкий рост числа работ по изучению вторичных метаболитов, продуцируемых экстремофилами. С момента открытия пенициллина и до наших дней микромицеты, наряду с актинобактериями, являются одним из самых продуктивных источников антибиотических соединений, применяемых в медицине и сельском хозяйстве. Многие авторы рассматривают экстремофильные микромицеты как перспективный источник малых молекул с необычным механизмом действия или значительной структурной новизной. В предлагаемом обзоре обобщены новейшие (за 2018–2019 гг) экспериментальные данные об антибиотических соединениях, продуцируемых экстремофильными микромицетами с различными типами адаптации. Активные метаболиты классифицированы по типу структуры и биосинтетическому происхождению. Обобщены данные по биологической активности выделенных метаболитов.

Ключевые слова: антибиотики, экстремофилы, микромицеты, экстремальные местообитания, резистентность, биотехнология

DOI: 10.31857/S0132342320060020

ВВЕДЕНИЕ

Резистентность патогенов к используемым антимикробным средствам и появление "новых" патогенов, подобных коронавирусу, является глобальной угрозой современного здравоохранения. Проблема, вызванная ненадлежащим применением и утилизацией антимикробных средств (при самолечении, в животноводстве и т.д.), усугубляется сильным снижением темпов разработки новых антибиотиков из-за их низкой инвестиционной отдачи [1, 2]. Разработка новых анти-инфекционных средств и методов борьбы с распространением резистентных микроорганизмов названа приоритетной задачей как на международном, так и на национальном уровне и зафиксирована в ряде политических документов: Резолюция ООН A/RES/71/3 [3], Глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам ВОЗ [4], Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации [5].

[1] Обзорная статья победителей конкурса РФФИ "Экспансия", 2019 г.

Сокращения: AV – противовирусная активность; AB – антибактериальная активность; AF – антифунгальная активность; CT – цитотоксическая активность; AP – антипротозойная активность; AT – антитуберкулезная активность; С. – ссылки на литературу за 2018–2019 гг; В. – порядковый номер вещества; MRSA – Метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*; MRSE – Метициллин-резистентный *S. epidermidis*; EC_{50} – полумаксимальная эффективная концентрация; IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования; MIC – минимальная ингибирующая концентрация; Me – метил.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (499) 246-69-83; эл. почта: anton2rin@gmail.com).

Как показывает анализ данных о внедрении низкомолекулярных соединений в медицинскую практику за период 1981–2019 гг., природные вещества, их полусинтетические производные и миметики являются важным источником новых терапевтических агентов. А в некоторых областях (например, антибактериальные и противоопухолевые средства) они являются основным источником новых лекарств [6]. Таким образом, поиск и исследование соединений из различных природных источников остается одним из ключевых направлений в разработке новых анти-инфекционных агентов.

Однако традиционный (фенотипический) подход к скринингу и выявлению активных веществ не позволяет серьезно расширить "химическое пространство" вторичных метаболитов. Один из путей решения данной проблемы – изучение труднодоступных и малоисследованных местообитаний. В частности, в последнее время наблюдается резкий рост числа работ по изучению вторичных метаболитов, продуцируемых экстремофилами. Экстремофильные микроорганизмы, т.е. способные нормально функционировать при экстремально высоких или низких температурах, давлении и др. условиях внешней среды, уже несколько десятилетий находятся в фокусе внимания микробиологов из-за биотехнологического потенциала их ферментов. Последние (называемые также экстремозимами) нашли применение в производстве продуктов питания, моющих средств и других отраслях промышленности. При этом обитатели экстремальных экониш долгое время оставались практически неизученными с точки зрения химии природных соединений. Современные тенденции в биотехнологии свидетельствуют о высоком потенциале обитателей таких экониш в качестве продуцентов новых специализированных метаболитов с самыми разнообразными свойствами [7].

Как правило, экстремофилы классифицируют по факторам адаптации, спектр которых довольно широк. Для рассмотренных в данной работе продуцентов такими факторами являются температура, соленость, давление, солнечная радиация и уровень pH (рис. 1). Организмы, способные адаптироваться к нескольким факторам, называют полиэкстремофилами.

Грибы и грибоподобные микроорганизмы являются самыми многочисленными эукариотическими организмами на планете, а присутствие в самых разнообразных экстремальных экосистемах делает их важным объектом исследования [8]. С момента открытия пенициллина и до наших дней микромицеты, наряду с актинобактериями, являются одним из самых продуктивных источников антибиотических соединений, применяемых в медицине и сельском хозяйстве [9]. Многие авторы рассматривают экстремофильные микромицеты как перспективный источник малых молекул с необычным механизмом действия или значительной структурной новизной. Данная работа посвящена обобщению последних (за 2018–2019 гг.) литературных данных о вторичных метаболитах экстремофильных микромицетов с антибиотической активностью.

Природные соединения, в том числе и биоактивные, выделенные из экстремофильных грибов с различными типами адаптации, были рассмотрены в недавнем обзоре, охватывающем литературу до 2017 года [10]. Также существует ряд специализированных обзоров, посвященных биотехнологическому потенциалу грибов и других микроорганизмов с различными типами адаптации: психрофилов [11, 12], ацидофилов [13], галофилов [14].

Среди экстремофильных местообитаний в данном обзоре отдельно выделены несколько типов, предполагающих комбинацию различных факторов адаптации. Прежде всего, это микромицеты выделенные из морских местообитаний на глубине менее 200 м (из морских губок, отложений прибрежных зон – кроме арктического/антарктического шельфа, моллюсков, кораллов, водорослей, асцидий и пр.), обозначенные далее дескриптором "морские". Морские экосистемы весьма разнообразны по температурным колебаниям (от −1.5°C в морском льду, до 400°C в глубоководных гидротермальных источниках), давлению (1–1000 атм.), освещенности (от полной темноты до эвфотических зон), составу и концентрации питательных веществ [15]. Грибы часто ассоциируются с различными морскими беспозвоночными, водорослями, растениями, способствуя круговороту питательных веществ и разложению органики [16]. В связи с уникальными особенностями полиэкстремофильной адаптации и широким спектром вторичных метаболитов, грибы морского происхождения являются интересным объектом с точки зрения расширения пространства фармакофоров [7, 17]. Высокий интерес к морским микромицетам нашел отражение в ряде обзоров, обобщающих литературу по их биоразнообразию и спектру метаболитов [18–35]. Вторичные метаболиты морских микромицетов упоминаются в обзорах, посвященных биотехнологическому потенциалу всего биоразнообразия морских микроорганизмов [18, 24, 26, 27, 33, 34], а также описаны в ряде специализированных обзоров. В частности, в последние годы обобщенны данные об активных вторичных метаболитах распространенных среди морских микроорганизмов родов микромицетов – *Phoma* [28], *Penicillium* [21] и *Aspergillus* [30]. Растущее число публикаций по новым соединениям с биологической активностью, выделенным из морских микромицетов, привело к появлению обзоров, посвященных как их активным метаболитам в целом [19, 20, 23, 29], так и

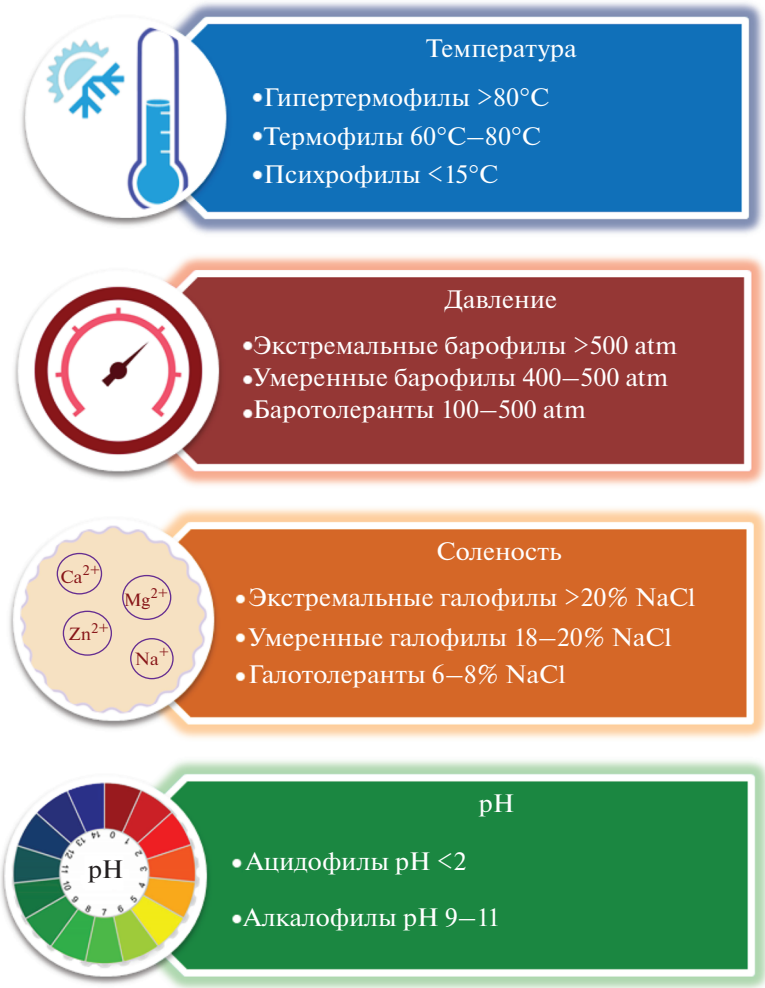


Рис. 1. Распространенные факторы адаптации экстремофилов.

конкретным химических классам соединений – антрахинонам [22] и пептидам [32].

Дескриптором “глубоководные” обозначены продуценты, отобранные из из морских местообитаний на глубине от 200 м и более (образцы донных отложений, воды и пр.). Глубоководная среда представляет собой одну из самых обширных экосистем на планете, поскольку 95% океанов Земли имеют глубину более 1000 м. Эти местообитания характеризуются температурами ниже 2°C, полной темнотой на глубинах более 250 м и низким уровнем кислорода. Глубоководные грибы, в основном, присутствуют в донных отложениях [15, 16]. Антибиотические вторичные метаболиты грибов, выделенных из глубоководных местобитаний, упоминаются в ряде недавних обзоров по биотехнологическому потенциалу и биоразнообразию глубоководных морских эконишь [26], грибов аноксичных вод [31] и прочих глубоководных местообитаний [35].

Дескриптором “мангровые” обозначены микроорганизмы, выделенные из почв мангровых лесов; корней, ветвей, листьев, плодов мангровых растений. За последние 15 лет число вторичных метаболитов из грибов, ассоциированных с мангровыми растениями, неуклонно растет, что свидетельствует о большом потенциале этой экологической ниши. В последнее время была обобщена литература по некоторым биоактивным соединениям мангровых почвенных грибов и эндофитов мангровых растений [27], а также по характеристике вторичных метаболитов мангровых грибов рода *Talaromyces* [25].

Дескриптором “Арктика/Антарктида” выделены микромицеты, изолированные из донных отложений прибрежных районов, почв и почвоподобных образований арктических и антарктических зон.

Вещества с различными типами антибиотической активности (противовирусная, антибак-

териальная, антифунгальная, цитотоксическая, антигельминтная) в обзоре сгруппированы по типу структур, с учетом их биосинтетического происхождения (пептиды, дикетопиперазины и родственные соединения; поликетиды, ксантоноиды и родственные соединения; алкалоиды; терпеноиды, стероиды и родственные соединения; соединения смешанного и неустановленного происхождения). Поликетидные соединения, ввиду большого количества, разбиты на несколько групп по типу химической структуры (хиноны; хромоны, бензофеноны и ксантоны; прочие поликетиды). Конфигурации стереоцентров указываются для тех соединений, для которых в оригинальных работах проведены соответствующие исследования. Для соединений, относительная конфигурация которых устанавливалась на основании спектров ЯМР, приведены планарные структурные формулы. Структуры и номера веществ, описаных ранее и выделенных повторно, в таблицах и на рисунках выделены серым.

1. ПЕПТИДЫ, ДИКЕТОПИПЕРАЗИНЫ И РОДСТВЕНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Среди биологически активных метаболитов экстремофильных микромицетов был выделен ряд соединений пептидной природы разнообразных структурных типов: новое семейство циклических пептидов небольшого размера (**1–5**), серия дикетопиперазинов и родственных соединений (**6–21**), а также два типа линейных пептидов с выраженной цитотоксичностью (**22–25**, **26**). Данные о биологической активности соединений обобщены в табл. 1.

Циклические пептиды, названные акремонпептидами A–D (**1**–**4**), выделенные из морского микромицета [36], представляют собой природные сидерофоры. Хелатирующий структурный фрагмент молекул акремонпептидов имеет гидроксаматную природу и образован остатками N^5-гидрокси-N^5-ацетил-L-орнитина (рис. 2). Высокое сродство этих соединений к трехвалентным ионам металлов привело к выделению акремонпептида D также в виде комплекса с ионами алюминия(III) (**5**). Основной интерес представляет умеренная противовирусная активность, проявляемая акремонпептидами.

В последние годы экстремофильные микромицеты стали источником ряда новых соединений, относящихся к структурному классу дикетопиперазинов. Так, из морского гриба рода *Penicillium* [37] был выделен 2,5-дикетопиперазин, названный пенициллатид B (**6**), принадлежащий к семейству известных ранее пептидов, выделенных из других морских источников [38, 39]. Также недавно из экстремофильного микромицета [40] был выделен новый представитель семейства фузаперазинов – фузаперазин F (**9**), обладающий умеренной цитотоксичностью. Интересно, что выделенный вместе с ним известный аналог фузаперазин E [41], отличающийся геометрией двойной связи, активности не проявил. Эти соединения являются типичными представителями структурных семейств антибиотиков, к которым относятся.

Дикетопиперазин васпердилламид B (**10**), содержащий необычную *napa*-нитробензойную группу был впервые получен при культивировании морского микромицета *Aspergillus ochraceus* [42].

Помимо новых соединений, был обнаружен ряд ранее известных активных метаболитов, относящихся к классу дикетопиперазинов, в том числе цикло-(D-Pro-L-Phe) (**7**) [38] и цикло-(D-Pro-L-Phe) (**8**) [39], для которых был уточнен спектр активности и обнаружена селективная цитотоксичность в отношении некоторых линий опухолевых клеток. Также была обнаружена антибактериальная активность известного дикетопиперазина цикло-(L-Trp-L-Phe) (**11**) [43], выделенного из психротолерантного микромицета [44]. Циклопенол (**12**), известный грибковый метаболит [45], выделенный из донного гриба вида *Penicillium chrysogenum* [46], проявил умеренную цитотоксическую активность.

Отдельного упоминания стоят выделенные представители класса дикетопиперазинов, имеющие алкалоидную природу. Химическое изучение вторичных метаболитов глубоководного донного микромицета *Penicillium granulatum* MC CC 3A00 475 [47] привело к обнаружению ранее неописанного дикетопиперазина, названного рокфортином J (**14**), наряду с 3 известными аналогами: нейротоксинами рокфортином C (**15**) [48]; рокфортином F (**16**) [49] и мелеагрином (**17**) [50]. Слабую цитотоксическую активность проявил выделенный из кораллового гриба *Penicillium* sp. TJ403-1 [51] известный дикетопиперазиновый алкалоид бревикомпанин G (**18**) [52], структурно напоминающий семейство рокфортинов.

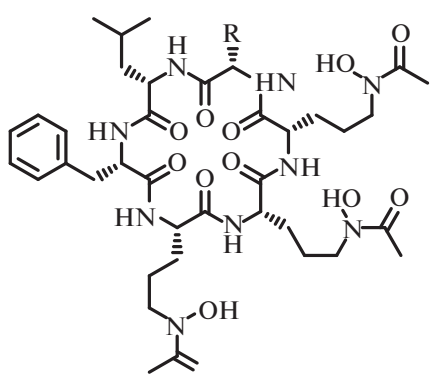
Три пары энантиомерных спироциклических дикетопиперазиновых алкалоида, названные вариеколортинами A–C (**19**–**21**, рис. 3), обладающие необычным спироциклическим скаффолдом, были выделены из морского микромицета *Eurotium* sp. SCSIO F452 [53].

Наряду с новыми терпеноидами, показавшими заметную активность, из культуральной жидкости штамма *Talaromyces purpurogenus* [54] были выделен дикетопиперазиновый алкалоид 6-метоксиспиротрипостатин B (**13**), ранее проявивший цитотоксическую активность [55].

Среди линейных пептидов пептаиболы (нерибосомные линейные олигопептиды с восстановленным C-концевым фрагментом, содержащие α-разветвленные аминокислоты – α-аминоизобутановую кислоту и/или изовалин) являются рас-

Таблица 1. Данные о происхождении и биологической активности пептидных антибиотиков

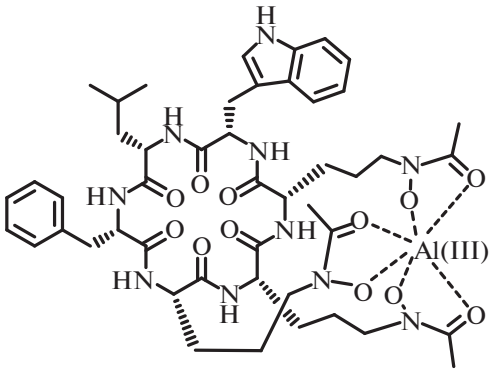
В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
1–5	*Acremonium persicinum* SCSIO 115	Морской	AV	**EC_{50} 8.7–16 μM** (Herpes Simplex Virus)	[36]
6	*Penicillium* sp.	Морской	CT	**IC_{50} 23.0–50 μM** (HCT-116, HepG2, MCF-7)	[37]
7			AB	**IC_{50} 38.9–102 μM** (HCT-116, HepG2, MCF-7)	
8	*Penicillium* sp. *Penicillium* sp. SCSIO 06720	Морской Глубоководный 4762 м	CT AB	**IC_{50} 94.0–114 μM** (HCT-116, HepG2, MCF-7) **MIC 0.10–0.13 μg/mL** (*Vibrio anguillarum*) [58]	[37] [59]
9	*Penicillium crustosum* HDN153086	Антарктида	CT	**IC_{50} 12.7 μM** (K562)	[40]
10	*Aspergillus ochraceus*	Морской	CT	**IC_{50} 3.0 μM** (A2780)	[42]
11	*Aspergillus sydowii* SP-1	Антарктида	AB	**MIC 0.12–1.0 μg/mL** (*Staphylococcus aureus*, MRSA, *S. epidermidis*, MRSE)	[44]
12	*Penicillium chrysogenum* MCCC 3A00292	Глубоководный 2076 м	CT	**IC_{50} 7.81–8.34 μM** (BEL-7402, BIU-87K562)	[46]
13	*Talaromyces purpurogenus*	Морской	CT	**IC_{50} 8.29–9.71 μM** (A-549, HL-60) [55]	[54]
14	*Penicillium granulatum* MCCC 3A00475	Глубоководный 2284 м	CT AB	**IC_{50} 19.5 μM** (HepG2)	[47]
15				**Качественная АВ активность** (*Bacillus coagulans* IMM 311, *B. licheniformis* IMM 308, *B. megateriurn* DSM 32, *B. subtilis* IMM 313, *B. cereus* IMM 307, *B. stearotberrnopbilus* DSM 22, *Mycobacterium pblei* IMM 255, *S. aureus* IMM 257, *Micrococcus luteus* DSM 348, *M. caseolyticus*) [48]	
16				**IC_{50} 13–33.6 μM** (BEL-7402, A-549, MOLT-4, HL-60) [49]	
17				**IC_{50} 7 μM** (HepG2)	
18	*Penicillium* sp. TJ403-1	Морской	CT	**IC_{50} 18.41–21.77 μM** (A-549, HL-60)	[51]
20	*Eurotium* sp. SCSIO F452	Морской	CT	**IC_{50} 12.5–15.0 μM** (SF-268, HepG2)	[53]
21				**IC_{50} 30.1–37.3 μM** (HepG2, SF-268)	
22	*Trichoderma velutinum*	На высоте около 800 м над уровнем моря, Индия/ Психротолерант	CT	**IC_{50} 30 μM** (A549)	[56]
23				**IC_{50} 2–30 μM** (HL-60, MDA-MB-231, A549)	
24				**IC_{50} 16–17 μM** (HL-60, MDA-MB-231, A549)	
25				**IC_{50} 4–7 μM** (HL-60, MDA-MB-231, A549, LS-180)	
26	*Emericellopsis alkalina*	Озеро Желтырь, Кулундинская степь, Россия/ Галоалкалофил	CT AB AF	**EC_{50} 2.8 μM (**HepG2) **MIC 4–32.5 μg/mL** (*Bacillus cereus* ATCC 14893, *S. aureus* FDA 209 P, *Listeria monocytogenes* EGDe) **MIC 2–4 μg/mL** (*Candida* sp., *Aspergillus* sp.)	[57]



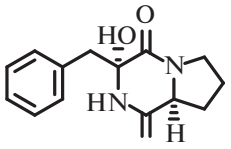
Акремонпептиды A-D
Acremonpeptides A-D
(1) R = CH_2OH
(2) R = Me
(3) R = A
(4) R = B

A =

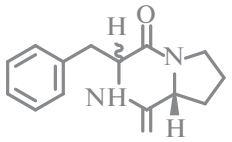
B =



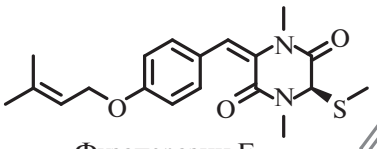
Al(III)-акремонпептид D
Al(III)-acremonpeptide D
(5)



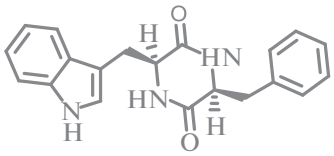
Пенициллатид B
Penicillatide B
(6)



Цикло-(D-Pro-L-Phe)
Cyclo-(D-Pro-L-Phe)
(7)
Цикло-(D-Pro-D-Phe)
Cyclo-(D-Pro-D-Phe)
(8)



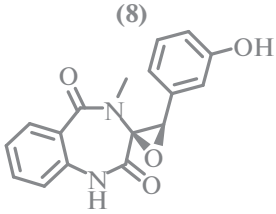
Фузаперазин F
Fusaperazine F
(9)



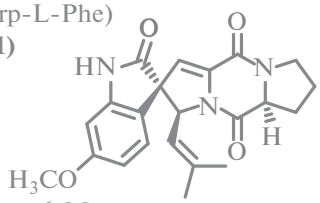
Цикло-(L-Trp-L-Phe)
Cyclo-(L-Trp-L-Phe)
(11)



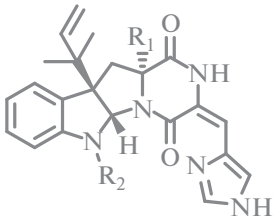
Васпергилламид B
Waspergillamide B
(10)



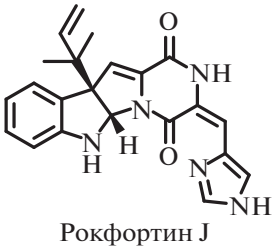
Циклопенол
Cyclopenol
(12)



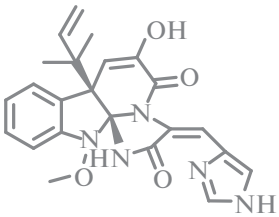
6-Метоксиспиротрипостатин B
6-Methoxyspirotryprostatin B
(13)



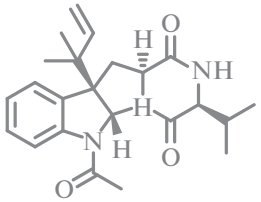
Рокфортин C
Roquefortine C
(15) R_1 = H, R_2 = H
Рокфортин F
Roquefortine F
(16) R_1 = H, R_2 = OCH_3



Рокфортин J
Roquefortine J
(14)



Мелеагрин
Meleagrin
(17)



Бревикомпанин G
Brevicompanine G
(18)

Рис. 2. Циклические пептиды и дикетопиперазины.

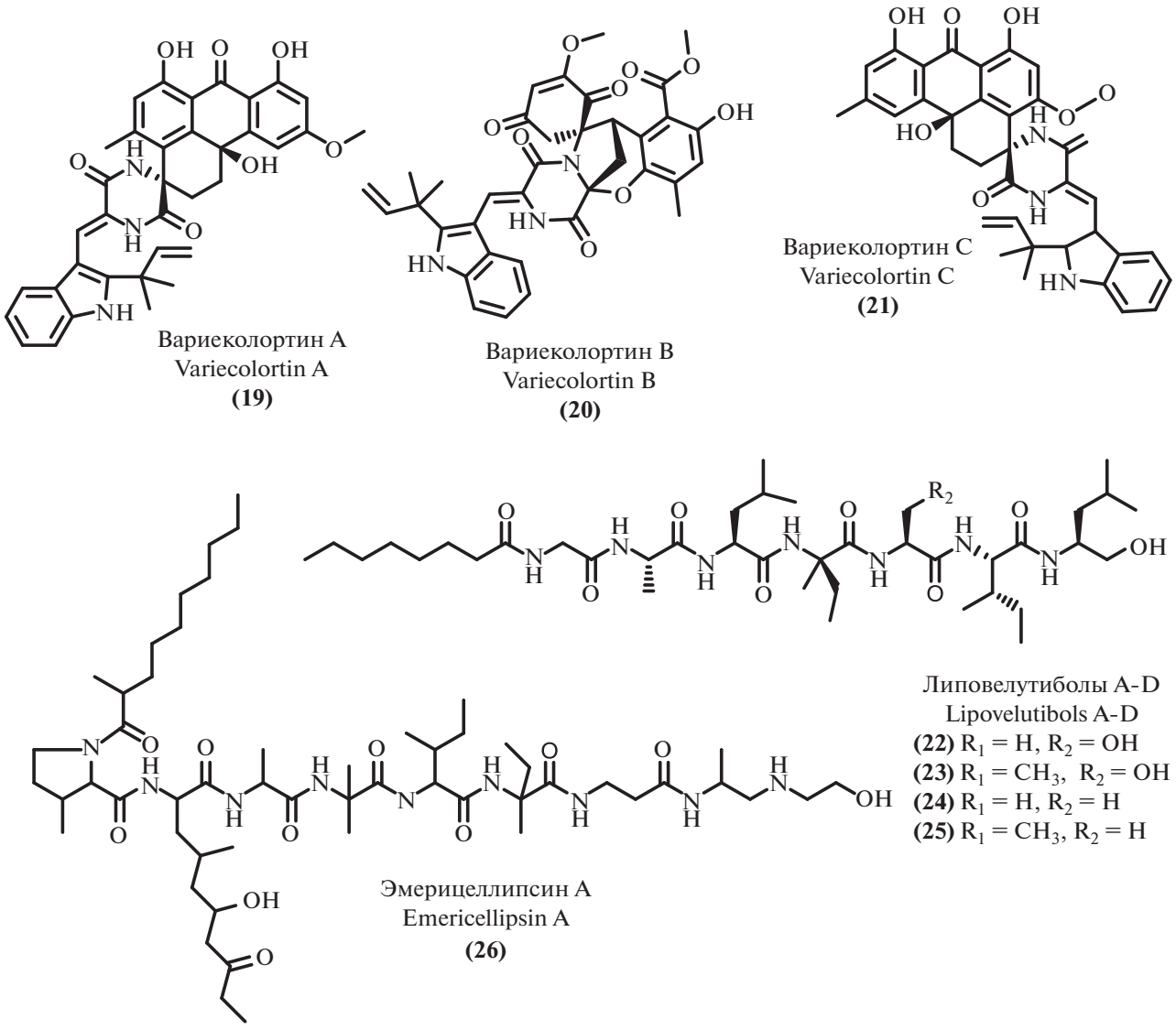


Рис. 3. Линейные пептиды и смешанные дикетопиперазины.

пространенным типом пептидных вторичных метаболитов микромицетов. В последние годы из экстремофильных микромицетов были выделены два новых представителя этого структурного типа – липовелутиболы A–D (**22**–**25**) [56] и эмерицеллипсин A (**26**) [57]. Особенностью липовелутиболов B (**23**) и D (**25**) является наличие непротеиногенной аминокислоты D-изовалина, наряду с отсутствием в их молекулах α-аминоизобутановой кислоты, ранее описанной во всех пептаиболах. Что особенно интересно, эти соединения проявляют более выраженную цитотоксическую активность, чем аналоги (**23**) и (**25**), содержащие α-аминоизобутановую кислоту (липовултиболы A и C). Еще один пептаибол, выделенный из экстремофильного микромицета, – эмерицеллипсин A (**26**), обладает заметной антифунгальной активностью наряду с выраженной цитотоксичностью. Интересной особенностью этого соединения является способность ингибировать образование бактериальных биопленок при практически полном отсутствии антибактериальных свойств.

2. ПОЛИКЕТИДЫ, КСАНТОНОИДЫ И РОДСТВЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

2.1. Хиноны

Поликетиды, которые можно отнести к хинонам, оказались достаточно широко представлены среди вторичных метаболитов экстремофильных микромицетов, выделенных за охваченный в данной работе период. Были выделены различные замещенные антрахиноны (**27**–**29**, **30**–**35**, **38**–**41**), димерные антрахиноны (**42**–**44**), серия периленхинонов (**45**–**50**, **37**) и трициклических нафтохи-

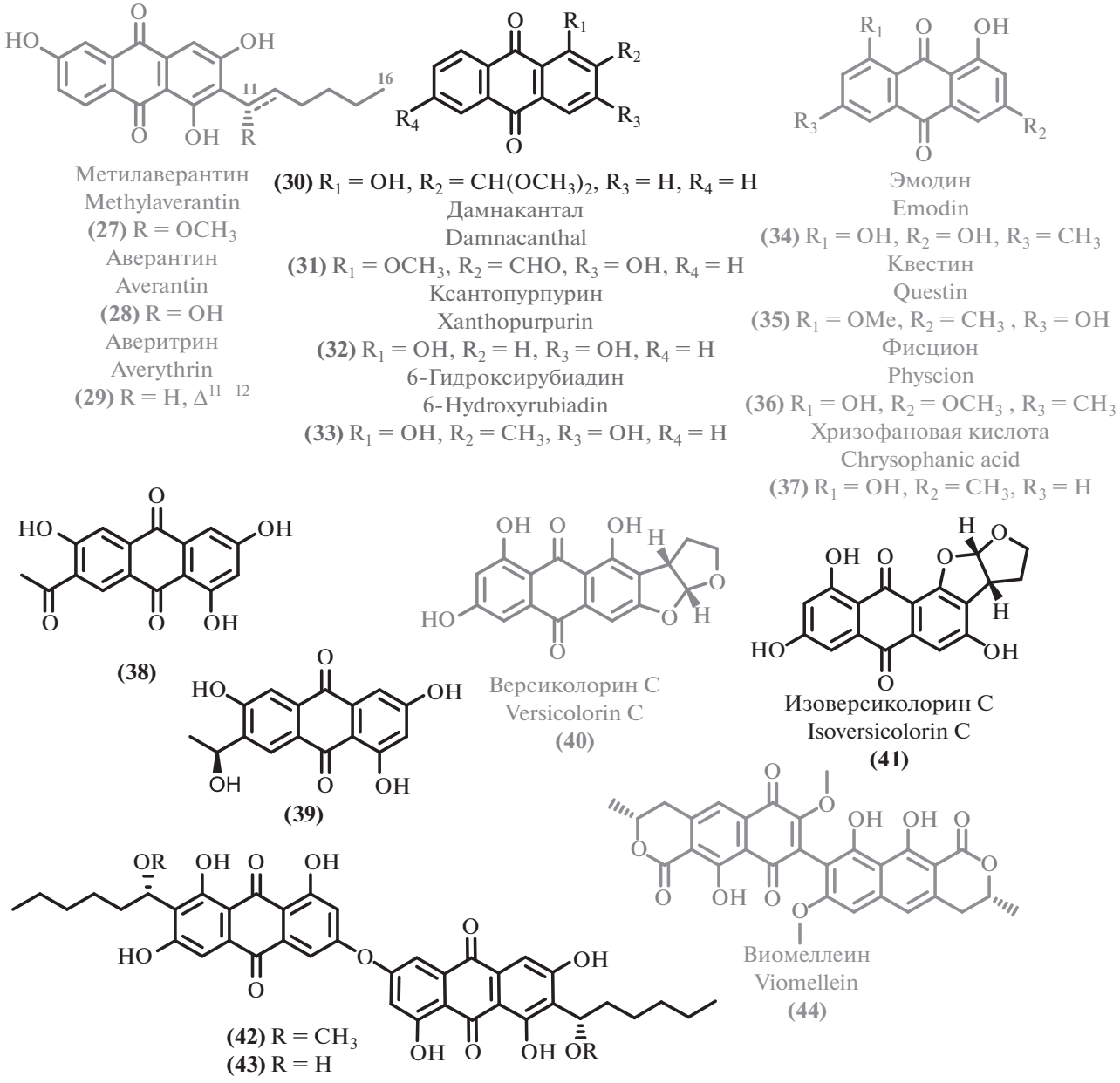


Рис. 4. Антрахиноны и димерные хиноны.

нонов (**51**–**53**). Данные об активности новых и известных хинонов обобщены в табл. 2.

Среди новых и активных антрахинонов, следует отметить близкие по строению соединения (**38**) и (**39**), продуцент которых (*Alternaria* sp.) был выявлен в результате масштабного скрининга штаммов морского происхождения [60]. Несмотря на близость химических структур, соединение (**38**) проявило примерно в 4 раза меньшую антибактериальную активность, чем (**39**). При этом оба соединения проявили сходный умеренный уровень антифунгальной активности. Еще один новый антрахинон (**30**), выделенный из глубоководного микромицета [61], проявил заметную антибактериальную активность. Согласно молекулярному докингу, эти соединения способны ингибировать топоизомеразу IV и AmpC β-лактамазу. Интересным примером расширения химического пространства вторичных метаболитов и применения стратегии OSMAC (“One Strain – MAny Compounds”, “один штамм – множество соединений”, [62]) является получение нового антархинона изоверсиколорина С (**41**). Культивирование с применением этанольного стресса (добавка 0.1% этанола) мангрового гриба *Aspergillus nidulans* MA143 [63] привело

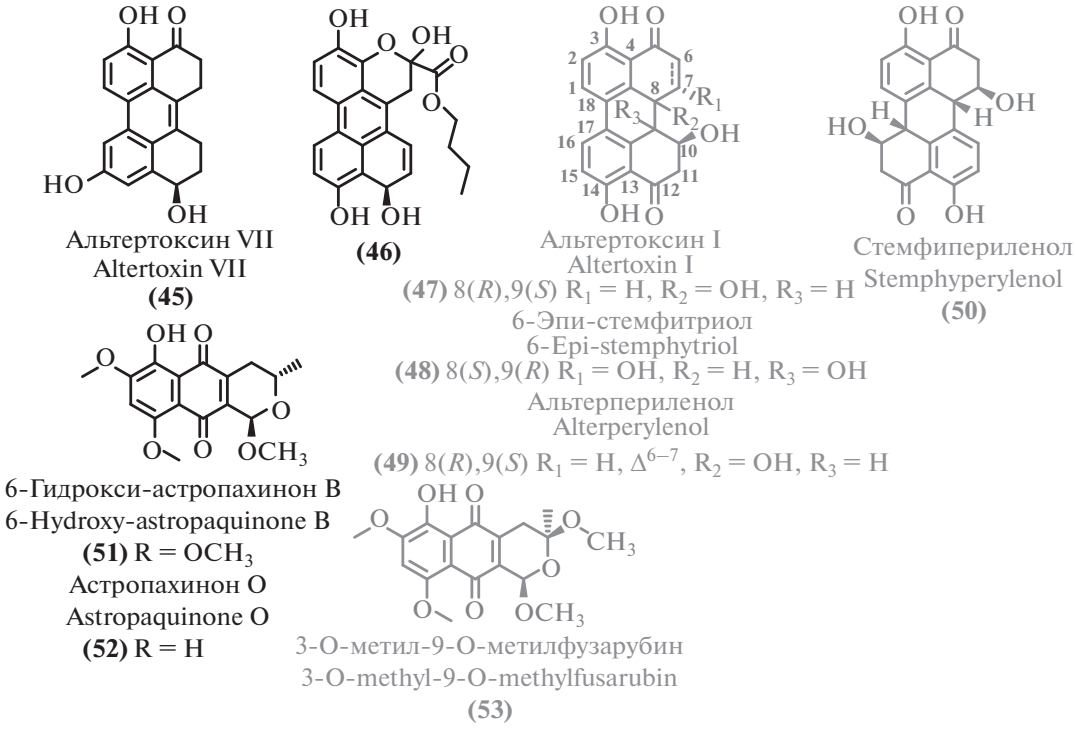


Рис. 5. Периленхиноны и нафтохиноны.

к получению (**41**), наряду с близким аналогом – пигментом версиколорином С (**40**) [64].

Прочие выделенные антрахиноны оказались описанными ранее соединениями, для некоторых из которых была обнаружена или уточнена биологическая активность. Например, помимо нового антрахинона (**30**), из донного микромицета *Aspergillus versicolor* [61] были выделены дамнакантал (**31**) [65], ксантопурпурин (**32**) [66], 6-гидроксирубиадин (**33**) [67], эмодин (**34**) [68–72]. Эмодин (**34**) был выделен также и из множества других экстремофильных микромицетов: термофильного *Penicillium* sp. RO-11 [73], морских грибов рода *Aspergillus* [74, 75], морского *Cochliobolus lunatus* SCSIO41401 [76], глубоководного микромицета *Aspergillus sydowii* C1-S01-A7 [77], морского *Penicillium* sp. ZZ380 [78] и *Aspergillus candidus* KUFA0062 [79]. В некоторых случаях для эмодина (**34**) обнаружены новые типы биоактивности: цитотоксическая [76], противотуберкулезная [75]. Родственные эмодину известные антрахиноны квестин (**35**) [70], фисцион (**36**) [80], хризофановая кислота (хризофанол) (**37**) [79, 81, 82] оказались существенно менее распространены.

Из культуральной жидкости морского штамма *Aspergillus versicolor* [83] были выделены димерные антрахиноны (**42**) и (**43**), содержащие необычную С–О–С эфирную связь. Эти новые биологически активные соединения проявили селективную антибактериальную активность против золотистого стафилококка. Также были выделены известные антрахиноны метилаверантин (**27**) [84], аверантин (**28**) [84], аверитрин (**29**) [85]. Еще одним примером димерного антрахинона является известный микотоксин – виомиеллеин (**44**) [86]. Источником этого соединения стал микромицет рода *Aspergillus* [42], выделенный из морской губки. Виомиеллин проявил высокую цитотоксичность в отношении линии клеток карциномы яичника человека A2780 и в отношении линии клеток мышиной лимфомы L5178Y.

Изучение морских штаммов рода *Alternaria* (*Alternaria* sp. SCSIO41014 [87]; *Alternaria* sp. [60]; *Alternaria alternata* L3111' [88]) привело к выделению ряда представителей структурного семейсва периленхинонов. В том числе, были выделены два новых периленхинона [87] альтертоксин VII (**45**) и новое производное (**46**), наряду с активными структурными аналогами: альтертоксином I (**47**) [89], стемфипериленолом (**50**) [60], 6-эпи-стемфитриолом (**48**) [90] и альтерпериленолом (**49**) [91]. Биологические свойства известных соединений были уточнены. Например, в исследовании [88] цитотоксические свойства проявил только альтерпериленол (**49**), но не его аналоги (**47**), (**50**). Тестирование цитототоксичности [87] показало заметную и селективную активность ранее описанного соединения 6-эпистемфитрола (**48**), что делает его перспективных для дальнейшего изучения в качестве противоопухолевого агента.

Таблица 2. Данные о происхождении и биологической активности хинонов

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
27	*Aspergillus versicolor*	Морской	CT AB AF	**IC_{50} 0.41–1.17 μg/mL** (A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT15) [84] **MIC 6.25 μg/mL** (*Streptococcus pyogenes* 308A) [84]	[83]
28				**IC_{50} 3.04–3.88 μg/mL** (A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT15) [84] **MIC 0.78, 3.13, 3.13, 3.13, 1.56 μg/mL** (*S. pyogenes* 308A, *S. pyogenes* 77A, *S. aureus* SG511, *S. aureus* 285, *S. aureus* 503) [84]	
29				**MIC 8–16 μg/mL** (*Bacillus subtilis*) [85] **MIC 16–32 μg/mL** (*Fusarium solani*) [85]	
42				**IC_{50} 22.39 μg/mL** (XF498) **Качественная АВ активность** (*S. aureus*)	
43				**Качественная АВ активность** (*S. aureus*)	
44	*Aspergillus ochraceus*	Морской	CT	**IC_{50} 5 μM** (A2780) **IC_{50} 5.3 μM** (L5178Y)	[42]
38	*Alternaria* sp. (P8)	Морские	AB AF	**MIC 3.91, 3.91, 7.81 μg/mL** (*P. syringae pv. lachrymans, Aphelenchus avenae, Erwinia carotovora*) **MIC 31.3 μg/mL** (*Pseudopestalotiopsis theae*)	[60]
39				**MIC 15.6, 7.81, 7.81 μg/mL** (*E. carotovora, P. syringae pv. lachrymans, A. avenae*) **MIC 31.3 μg/mL** (*P. theae*)	
51	*Fusarium napiforme*	Мангровый	AB	**MIC 6.3, 6.3 μg/mL** (*S. aureus* NBRC 13276, *P. aeruginosa* ATCC 15442)	[93]
52				**MIC 12.5, 6.3 μg/mL** (*S. aureus* NBRC 13276, *P. aeruginosa* ATCC 15442)	
53				**MIC 6.3, 6.3 μg/mL** (*S. aureus* NBRC 13276, *P. aeruginosa* ATCC 15442)	
40	*Aspergillus nidulans* MA143	Мангровый	AB	**MIC 1, 32, 16, 4, 8, 1 μg/mL** (*E. coli*, *Micrococcus luteus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *Edwardsiella ictaluri*, *V. parahaemolyticus*)	[63]
41				**MIC 32, 16, 64, 1, 4, 32 μg/mL** (*E. coli*, *Micrococcus luteus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *Edwardsiella ictaluri*, *V. parahaemolyticus*)	
30	*Aspergillus versicolor*	Глубоководный 2869 м	AB CT	**MIC 3.9, 7.8, 31.3, 62.5, 15.6 μg/mL (**MRSA ATCC 43300, MRSA CGMCC 1.12409, *V. vulnificus* MCCC E1758, *V. rotiferianus* MCCC E385, *V. campbellii* MCCC E333)	[61]
31				**MIC 62.5, 31.3, 62.5, 125 μg/mL (**MRSA ATCC 43300, MRSA CGMCC 1.12409, *V. vulnificus* MCCC E1758, *V. rotiferianus* MCCC E385, *V. campbellii* MCCC E333)	
32				**MIC 62.5, 125, 62.5, 62.5, 125 μg/mL (**MRSA ATCC 43300, MRSA CGMCC 1.12409, *V. vulnificus* MCCC E1758, *V. campbellii* MCCC E333, *V. rotiferianus* MCCC E385)	
33				**IC_{50} 1.3 μg/mL (**PRL-3) [67]	

Таблица 2. Окончание

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
34	*Aspergillus versicolor* *Penicillium* sp. *Cochliobolus lunatus* *Aspergillus fumigatus* *Aspergillus sydowii* *Penicillium* sp. *Aspergillus candidus* *Aspergillus* sp.	Глубоководный 2869 м Отложения горячего источника (45–65°C), Саудовская Аравия/Термофил Морской Морской Глубоководный 4950 м Морской Морской Морской	AT AB CT	**MIC 1.25 μg/mL** (BCG) [75] **MIC 15.6, 15.6, 31.3, 62.5 μg/mL** (MRSA ATCC 43300, MRSA CGMCC 1.12409, *V. vulnificus* MCCC E1758, *V. campbellii* MCCC E333, *V. rotiferianus* MCCC E385) [61] **MIC 12.5 μg/mL** (*P. aeruginosa*) [73] **MIC 50 μg/mL** (*S. aureus*, MRSA) [75] **MIC 16.1, 15.4, 15.7 μg/mL** (*V. vulnificus* MCCC E1758, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), *S. aureus* CGMCC 1.12409 (MRSA)) [77] **MIC 16, 64, 32 μg/mL** (*S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923) [71] **IC_{50} 2 μM (**HTB-176) [73] **IC_{50} 1.7–5.6 μM** (HepG-2, SGC7901) [76] **IC_{50} 27.1 μM (**HeLa) [77] **IC_{50} 23.8–65.2 μM (**HL-60, BEL-7402, A-549) [70]	[61] [73] [76] [75] [77] [78] [79] [74]
35	*Aspergillus* sp.	Морской	CT	**IC_{50} 73.2 μM** (HL-60) [70]	[74]
36	*Penicillium sp.* ZZ901	Морской	CT AB	**IC_{50} 34.68 μM** (клетки глиомы U87MG) **IC_{50} 30.22 μM** (C6)	[94]
45 **48**	*Alternaria* sp. SCSIO41014	Морской	CT	**IC_{50} 8.75–26.58 μg/mL** (K562, SGC-7901, BEL-7402) **IC_{50} 19.67 μg/mL** (K562)	[87]
49	*Alternaria* sp. *Alternaria alternata* L3111'	Морские	AB CT	**MIC 1.95 μg/mL** (*Clavibacter michiganensis*) [60] **IC_{50} 2.4–3.1 μg/mL** (A-549, HCT-116, HeLa) [88]	[60] [88]
47	*Alternaria* sp. SCSIO41014 *Alternaria alternata* L3111'	Морские	AV	**IC_{50} 1.42–2.2 μM** (HIV-1) [95]	[87] [88]
50	*Alternaria* sp. SCSIO41014 *Alternaria* sp. *Alternaria alternata* L3111'	Морские	AF	**MIC 7.81 μg/mL** (*P. theae*) [60] **MIC 125 μg/mL** (*A. brassicicola*) [60]	[87] [60] [88]
37	*Aspergillus candidus* KUFA0062	Морской	AV	**EC_{50} 0.21, 0.02 μg/mL** (Poliovirus type 2, Poliovirus type 3, Coxsackievirus type A21, Coxsackievirus type B4, Human rhinovirus type 2, Ross River virus, Herpes simplex virus type 1) [82]	[79]

Еще одним структурным семейством вторичных метаболитов экстремальных микромицетов оказались производные нафтохинона. Два новых нафтохиноновых производных 6-гидрокси-астропахинон B (**51**) и астропахинон D (**52**), наряду с известным 3-O-метил-9-O-метилфузарубином (**53**) [92], были выделены из культуральной жидкости мангрового эндофита *Fusarium napiforme* [93]. Выделенные соединения, помимо умеренной антибактериальной активности, проявили заметное фитотоксическое действие.

2.2. Хромоны, бензофеноны и ксантоны

Среди вторичных метаболитов экстремофильных микромицетов были обнаружены различные

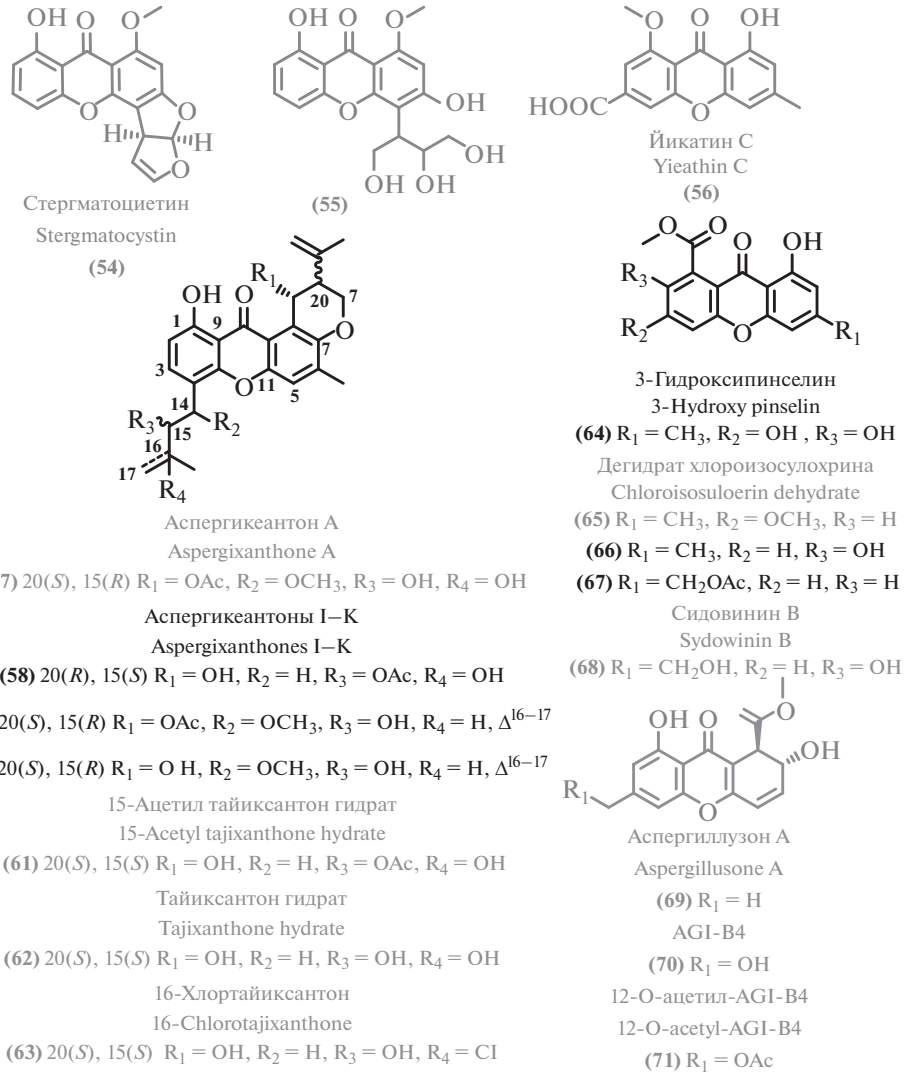


Рис. 6. Ксантоны и дигироксантоны.

ароматические соединения, в том числе ксантоны (**54**–**68**) и дигидроксантеноны (**69**–**71**); хромоны и дигидрохромоны (**72**–**84**); димерные хромоны (**85**–**89**); бензохиноны (**90**–**97**) и ряд родственных соединений (**98**–**110**). Данные о происхождении и активности ароматических поликетидов обобщены в табл. 3.

Ксантоны представляют собой распространенные антибиотические вторичные метаболиты микромицетов. Из различных экстремофильных источников был выделен ряд соединений этого класса (рис. 6).

Из морского гриба рода *Aspergillus* [96] были выделены три новых антибактериальных пренилксантона аспергиксантоны I-K (**58**–**60**), а также четыре известных аналога: аспергиксантон А (**57**) [97], 15-ацетил тайиксантон гидрат (**61**), тайиксантон гидрат (**62**) [98] и 16-хлортайиксантон (**63**) [98, 99]. Наибольшую активность против изученных бактерий проявил новый аспергиксантон I (**58**). Еще одним новым вторичным метаболитом этого класса оказался 3-гидроксипинселин (**64**) [100], не проявивший антибиотической активности.

Некоторые экстремофильные микромицеты стали источниками известных ксантонов: 3,8-дигидрокси-4-(2,3-дигидрокси-1-гидроксиметилпропил)-1-метоксиксантон (**55**) [101] был выделен из донного гриба *Penicillium chrysogenum* MCCC 3A00292 [46]; первичное изучение метаболитов гриба рода *Pseudopestalotiopsis* [102] привело к выделению описанного ранее дегидрата хлороизосулохрина (**65**) [103]; из морского штамма *Aspergillus versicolor* [83] был получен известный ксантон – цитотоксический стергматоцистин (**54**) [84].

Глубоководный микромицет, *Aspergillus sydowii* C1-S01-A7 [77] является продуцентом двух новых соединений – 2-гидрокси-6-формил-вертиксантона (**66**) и 12-*O*-ацетил-сидовинина А (**67**), а так-

же 22 известных соединений, в том числе имеющих антибиотическую активность: ксантонов сидовинина B (**68**) [104] и йикатина C (**56**) [105], их дигидропроизводных аспергиллузона A (**69**) [106] и AGI-B4 (**70**) [107]. Схожий спектр метаболитов был зафиксирован у морского гриба рода *Aspergillus* [100]: выделены 12-*O*-ацетил-AGI-B4 (**71**) [77] и аспергиллузон A (**69**) [106]. AGI-B4 (**70**) проявил заметную цитотоксичность и селективность по сравнению со структурными аналогами (например, *O*-ацилированными). Таким образом, ядро дигидроксиксантенона и свободная гидроксильная группа в положении C-12 являются обязательными структурными мотивами для обеспечения цитотоксической активности ксантонов этого типа (рис. 6).

Помимо ксантонов, были выделены соединения, содержащие хромоновое ядро, в том числе и ранее неописанные. Так, из гриба морского происхождения [108] был выделен новый хромон кониохаэтон M (**73**), наряду с известным аналогом – кониохаэтоном B (**72**) [78], проявившим низкую активность [109, 110]. Из донного микромицета [59] был выделен новый хромон кониохаэтон L (**74**), а также ряд известных: оксаликумон A (**80**) [111], эфир β-диверсоноловой кислоты (**81**), пеницилоцитрин A (**82**) [112]. Среди трех новых поликетидов, выделенных из мангрового эндофита *Colletotrichum gloeosporioides* [113], был получен (2*S*)-2,3-дигидро-5,6-дигидрокси-2-метил-4*H*-1-бензопиран-4-он (**75**), проявляющий антибактериальные свойства. Еще один новый хромон псевдопесталон (**98**) был получен при первичном изучении упомянутого выше гриба рода *Pseudopestalotiopsis* [102]. Из морского гриба рода *Penicillium* [114] были выделены новые хромоны: пьянохромон (**76**), спирофуранохромон (**77**), 7-гидрокси-6-метокси-4-оксо-3-[(1*E*)-3-оксобут-1-ен-1-ил]-4*H*-хромен-5-карбоновая кислота (**83**), наряду с известной ангидрофульвиновой кислотой (**84**) [115].

Следует отметить также мангровый эндофит *Cladosporium* sp. [116], который стал источником нового гликозилированного хромона (**78**), наряду с известным ранее 7-*O*-α-D-рибозил-5-гидрокси-2-пропил-хромоном (**79**) [117], проявившим цитотоксические свойства.

Еще одним структурным семейством ароматических поликетидов, выделенных из экстремофильных грибов, являются димерные хромоны. Из новых соединений этого класса можно отметить выделенный из морского гриба рода *Penicillium* [114] неописанный ранее димер пиранохромона (**86**), не проявивший антибиотических свойств.

Что касается ранее описанных димерных хромонов, для некоторых из них были расширены данные о биологической активности. Так, для выделенного из морского микромицета рода *Penicillium* [118] 4,4'-связанного изомера секалоновой кислоты D (**85**), известного прежде всего своими бактерицидными свойствами [119], была обнаружена существенная цитотоксическая активность. Стереоизомер секалоновой кислоты D (**88**) [120], также проявивший цитотоксическую активность, был обнаружен в мангровом грибе рода *Cladosporium* [121]. Еще одно родственное соединение, секалоновая кислота A (**87**) [122], было выделено из морского гриба рода *Penicillium* [114]. Описанный ранее ксантон пурпуреон (**89**) [76, 123] проявил цитотоксическую активность [76].

Наряду с описанными выше ксантонами и хинонами, при изучении вторичных метаболитов микромицетов обнаруживали структурно сходные соединения, прежде всего бензофеноны. Например, микромицет рода *Penicillium* мангрового происхождения [124] стал источником двух новых бензофенонов: антибактериального пенибензофенона A (**92**) и цитотоксичного пенибензофенона B (**93**), наряду с известным бензофеноном сулохрином (**90**) [70, 125].

Другим примером служит термофильный микромицет *Aspergillus* sp. YQ-13 [126], выделенный из гидротермальных источников. Он был изучен с точки зрения спектра вторичных метаболитов. Новое природное соединение – метиловый эфир 3-гидрокси-2-(2-гидрокси-6-метокси-4-метилбензоил)-5-метокси бензойной кислоты (**94**) – проявило низкую антибактериальную активность. При этом заметную активность проявил известный метаболит – 1,2-секо-трипацидин (**95**) [127].

Новый антибиотик, названный нигронафтафенилом (**97**), выделенный из магрового эндофита [128], проявил широкий спектр биологической активности, в том числе противовоспалительные свойства и способность к ингибированию альфа-глюкозидазы, что делает его перспективным для дальнейшего изучения.

Изучение некоторых экстремофильных микромицетов привело к выделению известных бензофенонов. Так, скрининг морских микромицетов на антибактериальную активность выявил штамм-продуцент шести известных метаболитов [74], в том числе и бензофенона сулохрина (**90**) [70, 125]. Еще один описанный бензофенон хлороизосулохрин (**91**) [103] был выделен при изучении вторичных метаболитов гриба рода *Pseudopestalotiopsis* [102].

Помимо новых бензофенонов, изучение вторичных метаболитов экстремофильных микромицетов привело к выделению ряда структурно близких соединений. Из морского гриба рода *Penicillium* [114] был выделен новый хромен 1-гидрокси-12-метоксицитромицин (**103**), наряду с известным аналогом цитромицином (**102**) [129].

Донный гриб *Penicillium chrysogenum* МССС 3A00292 [46] продуцирует серию родственных со-

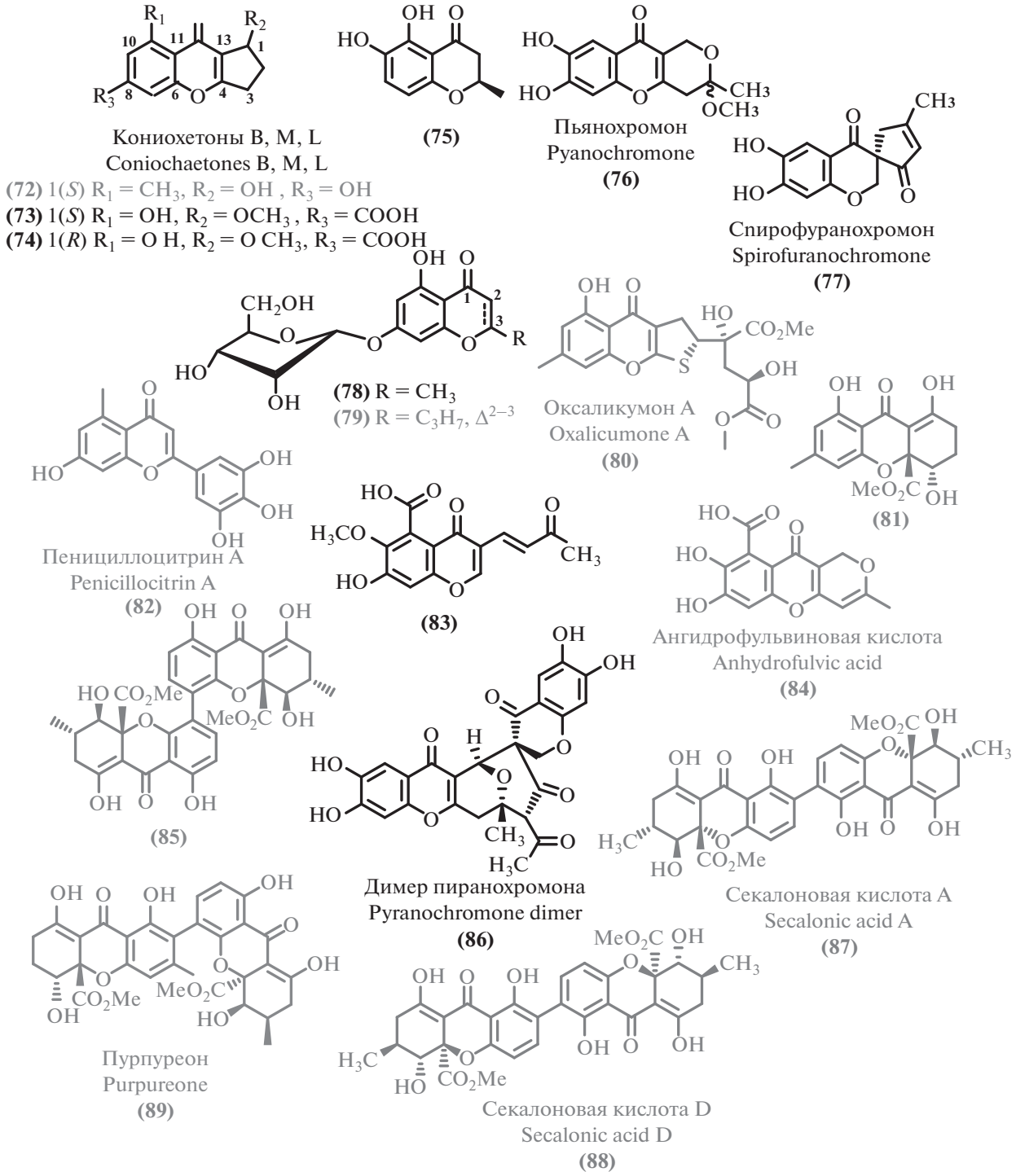


Рис. 7. Хромоны и димерные соединения.

единений: ранее неописанные пенициверсиолы A–C (**99**–**101**), изученные в качестве цитотоксических агентов. Интересно, что цитотоксические свойства проявляет пенициверсиол A (**99**), но не пенициверсиолы B и C (**100**, **101**).

Пять новых производных фуникона, названные пинофилонами A-E (**104**–**108**) были выделены из почвенного мангрового продуцента *Penicillium pinophilum* SCAU037 [130] наряду с 18 биосинтетически родственными известными соединениями, некото-

Таблица 3. Данные об активности и происхождении хромонов, бензофенонов и ксантонов

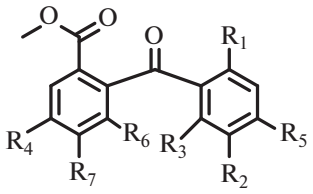
В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
54	*Aspergillus versicolor*	Морской	CT	**IC_{50} 11.25–17.36 μg/mL** (A-549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498) **IC_{50} 1.86–4.61 μg/mL** (A-549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT15) [84]	[83]
69 **71**	*Aspergillus versicolor* MF160003	Морской	AT	**MIC 20 μg/mL** (BCG) **MIC 40 μg/mL** (BCG)	[100]
85	*Penicillium oxalicum*	Морской	CT AB AF	**IC_{50} 0.484–26.6 μM** (BGC-823, SGC-7901, HGC-27, EC9706, KYSE450, CNE1, CNE2, SW620, SW480, LOVO, HuH-7, PLC/PRF/5, SKHEP, A549, SKMES-1, SPC-A1, 95D, Jeko-1, Raji, U937, A375, HFF, H22) **MIC 3.1 μg/mL** (*Sarcina lutea* ATCC 9341) [119] **MIC 12.5 μg/mL** (*Bacillus subtilis* CPI 219) [119] **MIC 6.3 μg/mL** (*Corynebacterium diphtheria* P.W.8) [119] **MIC 12.5 μg/mL** (*Micrococcus flavus* ATCC 10240) [119] **MIC 1.6 μg/mL** (*Trichophyton metagrophytes* IAM 8051) [119]	[118]
88	*Penicillium oxalicum Cladosporium* sp. JS1-2	Морской Мангровый	CT	**IC_{50} 0.833–24.1 μM** (BGC-823, SGC-7901, HGC-27, EC9706, KYSE450, CNE1, CNE2, SW620, SW480, LOVO, HuH-7, PLC/PRF/5, SKHEP, A549, SKMES-1, SPC-A1, 95D Jeko-1, Raji, U937, A375, HFF, H22)	[118] [121]
87	*Penicillium erubescens* KUFA0220	Морской	AB AF CT	**MIC 64.0, 64.0 μg/mL** (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, MRSA) **MIC 12.5, 25.0, 12.5, 12.5 μg/mL** (*S. aureus* ATCC 27154, *E. coli* ATCC 25922, *Sarcina ventriculi* ATCC 29068, *P. aeruginosa* ATCC 25668) [122] **MIC 6.25, 6.25, 12.5 μg/mL** (*C. albicans* ATCC 10231, *A. niger* ATCC 13496, *F. oxysporum f. sp. cubense*) [122] **IC_{50} 0.63, 1.05 μg/mL (**KB, KBv200)	
84				**MIC 64 μg/mL** (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212) **MIC 6.25, 6.25, 0.78, 6.25, 6.25, 3.13, 1.56, 3.13, 6.25 μg/mL** (*S. cerevisiae* IFO 0203, *C. albicans* IFO 1061, *C. utilis* ATCC 42402, *Schizosaccharomyces pombe* IFO 0342, *Hansenula anomala* IFO 0136, *Rhizopus chinensis* IFO 4745, *Mucor mucedo* IFO 5776, *Penicillium chrysogenum* IFO 4626, *A, niger* ATCC 6275) [115]	[114]
102				**MIC 64 μg/mL** (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212) **LD_{99} 0.1 μg/mL (**NS-1) [129]	

Таблица 3. Продолжение

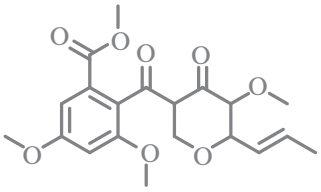
В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
90	*Aspergillus* sp. *Penicillium citrinum* HL-5126	Морской Мангровый	AB CT AF	**MIC 7.53, 15.06, 30.12 μM** (*P. aeruginosa*, *V. anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*) **IC_{50} 63.4, 83.1 μM (**HL-60, BEL-7402) [70] **MIC > 50 μg/mL** (*T. metagrophytes* IFO-5811, *Candida albicans* IAM-4966, *Pyricularia orysae* IFO-5279, *A. fumigatus* IAM-2004, *Helminthosporium sesamum* IAM-5012) [125]	[74] [124]
91 **65**	*Pseudopestalotiopsis* sp. PSU-AMF45	Морской	AF	**MIC 200 μg/mL** (*Cryptococcus neoformans* ATCC 90112) **MIC 200 μg/mL** (*Cryptococcus neoformans* ATCC 90112)	[102]
57 **58** **59** **60** **61** **62** **63**	*Aspergillus* sp. ZA-01	Морской	AB CT	**MIC 25 μM** (*V. parahemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*) **IC_{50} 1.8 μM** (A-549) [97] **MIC 1.56, 1.56, 3.12 μM** (*V. parahemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*) **MIC 6.25, 25.0, 25.0 μM** (*V. parahemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*) **MIC 3.12, 25.0, 12.5 μM** (*V. parahemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*) **MIC 12.5, 25.0, 12.5 μM** (*V. parahemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*) **MIC 6.25, 6.25, 12.5 μM** (*V. parahemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*) **MIC 25.0, 6.25, 25.0 μM** (*V. parahemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*)	[96]
72	*Penicillium* sp. ZZ380 *Penicillium citrinum* SCSIO 41017	Морские	AF	**Качественная AF активность** (*C. albicans, S. fimicola, A. furfuraceus*) [109]	[78] [108]
73	*Penicillium citrinum* SCSIO 41017	Морской	CT	**IC_{50} 16.0–46.4 μM (**SF-268, MCF-7, HepG-2, A549)	[108]
75	*Colletotrichum gloeosporioides*	Мангровый	AB	**MIC 12.5, 25.0, 25.0 μg/mL** (*B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*)	[113]
92 **93**	*Penicillium citrinum* HL-5126	Мангровый	AB CT	**MIC 20.0 μg/mL** (*S. aureus*) **IC_{50} 15.7 μg/mL (**A549)	[124]
97	*Nigrospora sphaerica*	Мангровый	CT AB AF	**IC_{50} 9.62 μM (**HCT 116) **MIC 4.0, 4.0, 4.0, 2.0, 2.0 μg/mL** (*B. subtilis* UBC 344, *B. subtilis* TISTR 088, *S. aureus* ATCC 43300, *B. cereus* TISTR 688, MRSA ATCC 33591, *E. coli* UBC 8161, *P. aeruginosa* ATCC 27 853) **MIC 2.0, 4.0, 8.0 μg/mL (***C. albicans* ATCC 90028, *C. gloeosporioides* UBC 3110, *A. niger* UBC 9214)	[128]

Таблица 3. Окончание

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
94 **95**	*Aspergillus* sp. YQ-13	Осадок гидротермальных жерл, Куэйшаньтао, Тайвань/Термофил	AB	**MIC 860.8, 40.93 μg/mL** (*P. aeruginosa*, *B. subtilis*) **MIC 394.1, 191.67, 58.21, 58.21 μg/mL** (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis*, MRSA)	[126]
66 **67** **68** **70** **56**	*Aspergillus sydowii* C1-S01-A7	Глубоководный 4950 м	AB CT	**MIC 16.3, 16.1 μg/mL** (MRSA ATCC 43300, MRSA CGMCC 1.12409) **IC_{50} 32.7 μM** (HepG2) **MIC 32.6, 31.8 μg/mL** (MRSA ATCC 43300, MRSA CGMCC 1.12409) **IC_{50} 25.2–42.3 μM** (A549, HepG2, HeLa) **MIC 32.6 μg/mL** (*V. rotiferianus*) **IC_{50} 1.5 μM** (L5178Y) [107] **IC_{50} 37.7 μM** (A549)	[77]
99 **55**	*Penicillium chrysogenum* MCCC 3A00292	Глубоководный 2076 м	CT	**IC_{50} 10.21 μM** (BIU-87) **IC_{50} 15.94 μM** (BEL-7402)	[46]
80 **81** **82**	*Penicillium sp.* SCSIO 06720	Глубоководный 4762 м	CT AB AF	**IC_{50} 11.7–99.0 μM** (A375, A549, HeLa, HepG2, SW-620, L-02) [111] **MIC 10.4, 46.9 μg/mL** (*S. aureus* ATCC 29213, MRSA-shh-1) **IC_{50} 40.0, 50.0 μg/mL** (A549, HeLa) [112]	[59]
89	*Cochliobolus lunatus* SCSIO41401	Морской	CT AB	**IC_{50} 41.3–47.9 μM** (SF-268, MCF-7, HepG-2, A549, 786-O) **MIC 50.0, 25.0, 13.0 μg/mL** (*S. aureus*, *E. rhusiophthiae*, *P. multocida*) **IC_{50} 31.36 μg/mL** (L6) [123] **IC_{50} 8.07 μg/mL** (*P. falciparum* NF54) [123] **MIC 125.0, 62.5, 62.5, 62.5, 62.5, 250.0, 62.5, 125.0, 125.0, 125.0 μg/mL** (*B. cereus* *L. monocytogene*, *L. monocytogene*, *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 8739, *K. pneumoniae* ATCC 11296, *K. pneumoniae* ATCC 11296, *P. stuartii* ATCC 29916, *P. stuartii* ATCC 29916, *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA01) [123] **IC_{50} 0.633 μg/mL** (*L. donovani*) [123] **IC_{50} 28.8 μg/mL** (*T. b. rhodesiense*) [123] **IC_{50} 14.41 μg/mL** (*T. cruzi*) [123]	[121]
109 **110** **96**	*Penicillium pinophilum* SCAU037	Мангровый	CT	**IC_{50} 0.2, 1.6 μM** (HL-60, CCRF-CEM) [131] **IC_{50} 20.0, 15.1 μg/mL** (KB, KBv200) [132] **IC_{50} 60 μg/mL** (HEp-2) [134] **Качественная AF активность** (*R. solani* RT23 *R. solani* RT20, *F. solani* (Mart.) Appel et Wollenw., *Cylindrocladium scoparium* Morgan, *Alternaria alternata* (Fries) Keissl.) [133]	[130]
79	*Cladosporium* sp. OUCMDZ-302	Мангровый	CT	**IC_{50} 40 μM** (HL-60, SMMC-7721, A-549, MCF-7, SW480) [117]	[116]

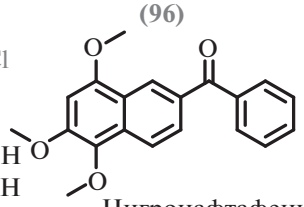


Сулохрин
Sulochrin
(90) $R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = OH, R_5 = CH_3, R_6 = OCH_3, R_7 = H$
Хлороизосулохрин
Chloroisosulochrine
(91) $R_1 = OH, R2 = H, R_3 = OH, R_4 = OCH_3, R_5 = CH_3, R_6 = OH, R_7 = Cl$

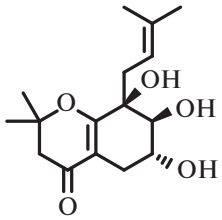


3-О-метилфуникон
3-O-methylfunicon
(96)

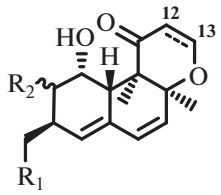
Пенибензофеноны A, B
Penibenzophenones A, B
(92) $R_1 = OH, R_2 = Cl, R_3 = OCH_3, R_4 = CH_3, R_5 = OCH_3, R_6 = OH, R_7 = H$
(93) $R_1 = OCH3, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = CH_3, R_5 = OCH_3, R_6 = OH, R_7 = H$
(94) $R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = OCH_3, R_5 = CH_3, R_6 = OH, R_7 = H$
(95) $R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = OH, R_5 = CH_3, R_6 = OCH3, R_7 = Cl$



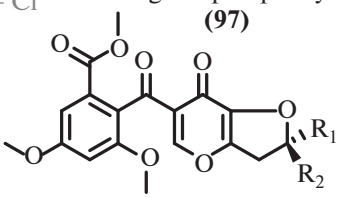
Нигронафтафенил
Nigronapthaphenyl
(97)



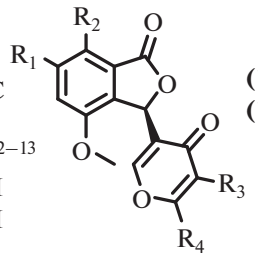
Псевдопесталон
Pseudopestalone
(98)



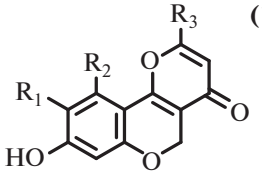
Пенициверсиолы A-C
Peniciversioles A-C
(99) $R_1 = OH, R_2 = H, \Delta^{12-13}$
(100) $R_1 = OH, R_2 = H$
(101) $R_1 = H, R_2 = OH$



Пинофилоны A, B
Pinophilones A, B
(104) $R_1 = H, R_2 = Me$
(105) $R_1 = Me, R_2 = H$



Пинофилоны C-E
Pinophilones C-E
(106) $R_1 = OH, R_2 = R_3 = H, R_4 = n\text{Pr}$
(107) $R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OMe, R_4 = n\text{Pr}$
(108) $R_1 = OH, R_2 = OMe, R_3 = H, R_4 = propenyl$



Цитромицин
Citromycin
(102) $R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = Me$
1-Гидрокси-12-метоксицитромицин
1-Hydroxy-12-methoxycitromycin
(103) $R_2 = OMe, R_2 = H, R_3 = Me$

Пенисимплициссин
Penisimplicissin
(109) $R_1 = OMe, R_2 = R_3 = H, R_4 = Me$
Метоксивермистатин
Methoxyvermistatin
(110) $R_1 = OMe, R_2 = H, R_3 = OMe, R_4 = propenyl$

Рис. 8. Бензофеноны и прочие родственные ароматические соединения.

рые из которых обладают высокой антибиотической активностью: пенисимплициссин (**109**) [131], метоксивермистатин (**110**) [132], 3-*O*-метилфуникон (**96**) [133, 134].

2.3. Прочие поликетиды

Помимо описанных выше соединений, экстремофильные микромицеты в изученный период стали источником ряда других поликетидов. Среди выделенных соединений можно выделить несколько структурных семейств. Из циклических сложных эфиров можно выделить изокумарины (**111**–**120**), дигидроизокумарины (**121**–**127**) и другие лактоны (**128**–**148**). Большая часть как новых, так и известных метаболитов можно отнести к фенолам и их производным (**149**–**176**), а также дифениловым эфирам (**177**–**189**). Из аро-

матических соединений существенное количество выделенных метаболитов относились к феналенонам (**190**–**198**), гризановым метаболитам (**199**–**201**) и азафилонам (**202**–**222**). Были получены также линейные поликетиды с различными боковыми цепями (**223**–**245**) и прочие поликетиды (**246**–**257**).

Изокумарины и их производные являются распространенными биоактивными метаболитами микромицетов [135]. Новые изокумарины были выделены также из мангрового миромицета *Ascomycota* sp. [136] – эндофита *Pluchea indica*. Этот штамм стал источником трех новых изокумаринов – дихлородиапортинтона (**116**), десметилдихлородиапортинтона (**117**) и десметилдихлородиапортинола (**114**), наряду с несколькими известными аналогами: дихлородиапортинолом (**115**) [137], десметилдихлородиапортином (**119**) [138], дихлородиапортином (**120**) [139, 140]. Прочие изокумарины, обладающие антибиотической активностью, оказались ранее описанными соединениями. Например, химическое изучение мангрового эндофита *Phyllosticta capitalensis* [141] выявило известное производное изокумарина, проявившее антибиотическую активность – 6,8-дигидрокси-5-метокси-3-метил-1*H*-изохромен-1-он (**118**) [142]. При изучении штамма *Alternaria* sp. SCSIO41014 [87] были получены изокумарины альтернариол (**111**) [143], 5-*O*-метиловый эфир альтернариола (**112**) [143], альтенуизол (**113**) [144].

Несколько новых соединений, выделенных из экстремофильных микромицетов, относятся к дигидроизокумаринам. Новое производное изокумарина, названное песталотиопизорин B (**121**), проявляющее умеренную антибактериальную активность, было выделено из штамма *Pestalotiopsis* мангрового происхождения [145]. Еще один новый дигидроизокумарин, нордигидроальтенуен A (**123**), был выделен при изучении штамма *Alternaria* sp. SCSIO41014 [87], наряду с известными биоактивными аналогами: (–)-3-*O*-ацетилальтенуеном (**126**) [143, 146], альтенузином (**155**) [147], дигидроальтенуеном A (**127**) [148]. Несколько известных дигидроизокумаринов были получены из других источников: из глубоководного микромицета [59] был выделен изокумарин (3*R*,4*S*)-6,8-дигидрокси-3,4,7-триметилизокумарин (**122**) [149]; кладоспорин (**124**) и 5'-гидроксиасперентин (**125**) [150] были выделенны из морского гриба [151].

Помимо производных изокумарина, при изучении экстремофильных микромицетов выделили серию лактонов различной природы (рис. 10). Из новых лактонов следует отметить четыре новых необычных серосодержащих соединения, которые были выделены из мангрового микромицета *Cladosporium* [152]. Лактоны были названы тиокладосполидами A-D (**128**, **130**–**132**). Также был выделен схожий известный антибиотик панданголид 3 (**129**) [152, 153]. Сравнение данных ЯМР новых макролидов и известного панданголида 3 (**129**) позволило пересмотреть его структуру, уточнить сайт присоединения сульфидной боковой цепи. Еще один новый 10-членный лактон декарестриктин Q (**135**), аналог декарестриктина B (**136**) [154], был выделен из гриба морского происхождения рода *Pseudopestalotiopsis* [102]. Существенную цитотоксичность проявил еще один структурно оригинальный депсидон, выделенный из штамма морского проихождения рода *Curvularia* [155], названный курдепсидоном A (**139**). Новое приозводное депсидона, названное ботриродином I (**141**), наряду с 8 известными соединениями, было выделено из почвенного мангрового микромицета *Lasiodiplodia theobromae* M4.2-2 [156]. Были обнаружены еще несколько антибиотиков: антифунгальные и цитотоксические ботриродины A, B, D (**142**–**144**) [157], соединения (**140**), (**134**) [156, 158]. Мангровый эндофит *Colletotrichum gloeosporioides* [113] стал источником нового лактона (**148**), который проявил антимикробную активность.

Отдельно следует отметить подход к активации молчащих биосинтетических кластеров микромицетов: у мутантного штамма *Penicillium purpurogenum* G59, полученного действием диэтилсульфата, наблюдался биосинтез нового поликетидного цитотоксичного соединения, пурпурогеновой кислоты (**145**) [159].

Кроме новых соединений, был получен ряд ранее описанных лактонов, проявляющих биологическую активность. Из гриба морского происхождения [108] был выделен известный ароматический лактон 8-деметокси-10-метокси-вентихинон C (**137**) [77, 160]. 8-деметокси-10-метоксивентрихинон C (**137**) был выделен также из донного микромицета, *Aspergillus sydowii* C1-S01-A7 [77]. Еще несколько обнаруженных лактонов оказались ранее описанными соединениями: альтерлактон (**147**) [143], выделенный при изучении штамма *Alternaria* sp. SCSIO41014 [87]; антибиотический лактон пенициллид (**138**) [161], полученный из почвенного мангрового продуцента *Penicillium pinophilum* SCAU037 [130]; нодулиспорон A (**146**) [162], найденный при изучении глубоководного микромицета [59]; аспердемин (**133**) [163], выделенный из глубоководного гриба *Penicillium chrysogenum* MCCC 3A00292 [46].

Значительная доля антибиотических соединений, выделенных из экстремофильных микромицетов, представляет собой фенолы и их производные, многие из которых были описаны впервые (рис. 11). Исследование вторичных метаболитов штамма *Zopfiella marina* [164] морского происхождения позволило выделить ряд ранее неописанных соединений: два производных салицилового альдегида (**161, 165**), пять дигидроизобензофу-

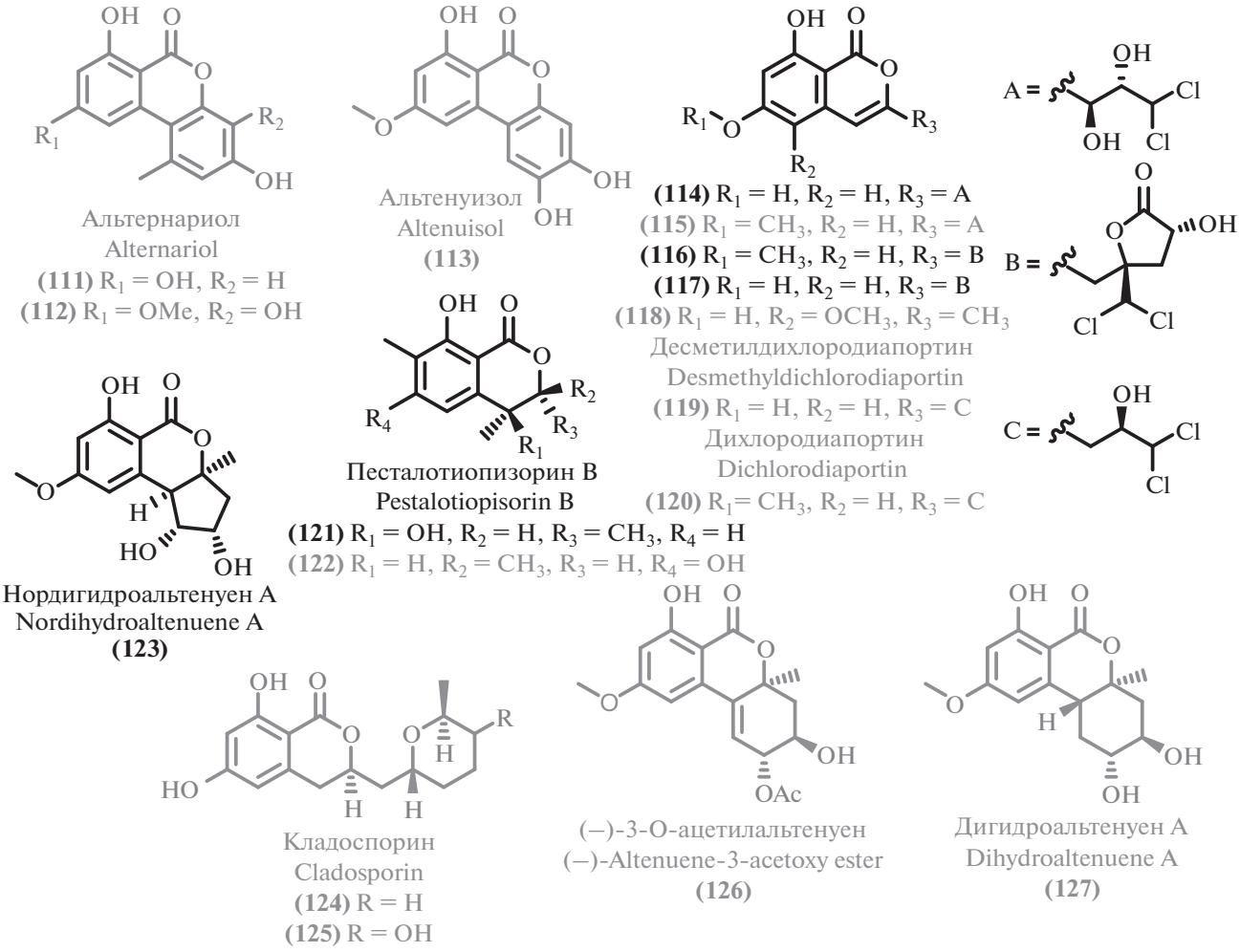


Рис. 9. Изокумарины и дигидроизокумарины.

ранов (**171**–**175**) и 5-хлор-3-деоксиизоохрациновую кислоту (**176**). Из них только производное (**161**) проявило антибактериальную активность, в т.ч. и противотуберкулезную.

Спектр вторичных метаболитов мангрового гриба рода *Dothiorella* [165] включает ряд фенолов с антибиотической активностью, прежде всего относящихся к структурному семейству дотиорелонов. Были выделены новые дотиорелоны K–M (**152**–**154**), а также известные производные цитоспорона: дотиорелоны A (**149**) [166], B (**150**), I (**151**) [167], цитоспорон A (**160**) [168].

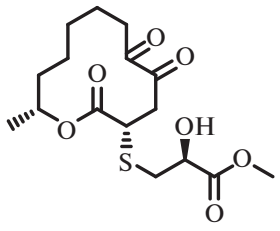
Новые поликетиды саркоподинолы A, B (**167**, **168**) были выделены из гриба *Sarcopodium* [169], обнаруженного в результате физико-химического скрининга 60 штаммов глубоководных микромицетов. Интересно, что соединение (**168**) проявило более широкий спектр цитотоксического действия, чем (**167**), что говорит о важности 5'-OH группы для реализации активности на некоторых клеточных линиях.

Разделение на основании биоактивности экстракта культуральной жидкости термофильного микромицета рода *Penicillium* [73], выделенного из горячего источника в Саудовской Аравии, привело к получению нового фенола (**162**). Из донного микромицета [59] был выделен 5-(2-гидроксипропил)-2,6-диметилрезорцин (**159**), не проявляющий биологической активности.

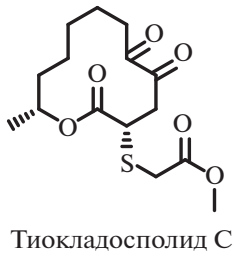
Мангровые эндофиты также оказались ценным источником биологически активных соединений этого типа. Так, из штамма *Colletotrichum gloeosporioides* [113], помимо упомянутого выше бензофенона (**75**) и лактона (**148**), был выделен новый поликетид (**166**). Мангровый эндофит *Cladosporium* sp. [116] стал источником серии новых фенолов (**163**, **164**). Из мангрового гриба *Aspergillus* sp. AV-2 [170] был выделен новый пренилированный бензальдегид диоксоауроглаухин (**156**), а также ряд его известных аналогов, из которых флавоглаухин (**157**) [171], известный ранее прежде всего как антиоксидант, проявил выраженную цитотоксическую активность.



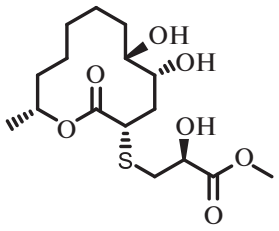
Тиокладосполид A
Thiocladospolid A
(128) R = H
(129) R = OH



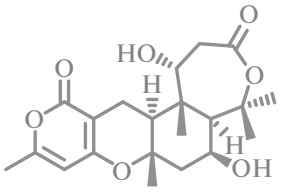
Тиокладосполид B
Thiocladospolid B
(130)



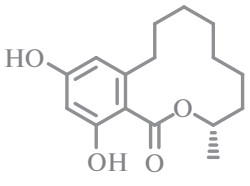
Тиокладосполид C
Thiocladospolid C
(131)



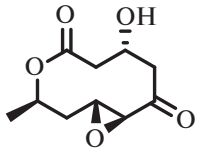
Тиокладосполид D
Thiocladospolid D
(132)



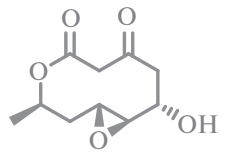
Аспердемин
Asperdemin
(133)



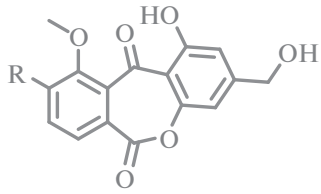
(134)



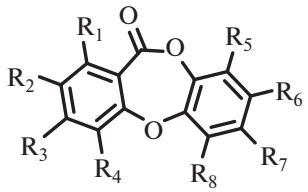
Декарестриктин Q
Decarestrictine Q
(135)



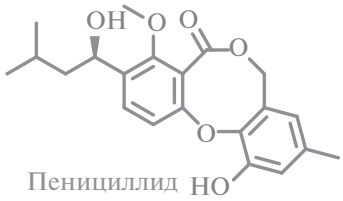
Декарестриктин B
Decarestrictine B
(136)



(137) R = H

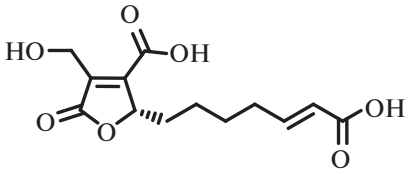


Курдепсидон A
Curdepsidone A
(139) R_1 = OH, R_2 = CHO, R_3 = OCH_3, R_4 = H, R_5 = CH_3, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H
(140) R_1 = CH_3, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = CH_2OCH_3, R_5 = H, R_6 = OH, R_7 = H, R_8 = CH_3
(141) R_1 = CH_3, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = CH_2OH, R_5 = OH, R_6 = OH, R_7 = H, R_8 = CH_3

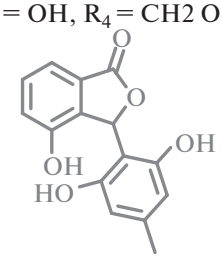


Пенициллид
Penicillide
(138)

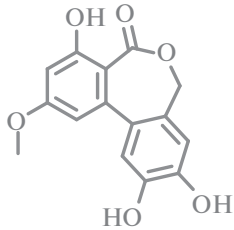
Ботриродины A, B, D
Botryorhodines A, B, D
(142) R_1 = CH_3, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = CHO, R_5 = H, R_6 = OH, R_7 = H, R_8 = CH_3
(143) R_1 = CH_3, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = CHO, R_5 = CH, R_6 = OH, R_7 = H, R_8 = CH_3
(144) R_1 = CH_3, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = CH2 O H, R_5 = H, R_6 = O H, R_7 = H, R_8 = CH_3



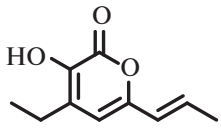
Пурпурогенная кислота
Purpurogenic acid
(145)



Нодулиспорон A
Nodulisporone A
(146)



Алтерлактон
Alterlactone
(147)



(148)

Рис. 10. Лактоны.

Также были выявлены описанные ранее фенолы. При изучении мангрового гриба рода *Cladosporium* [121] были получены известные поликетиды: кладоспорол E (**170**) [172], ранее не проявлявший заметной активности, и его более активный аналог кладоспорол C (**169**) [173]. Химическое изучение мангрового эндофита *Phyllosticta capitalensis* [141] выявило известный поликетид с антибиотической активностью – 3,4-дигидроксибензойную кислоту (**158**) [174, 175].

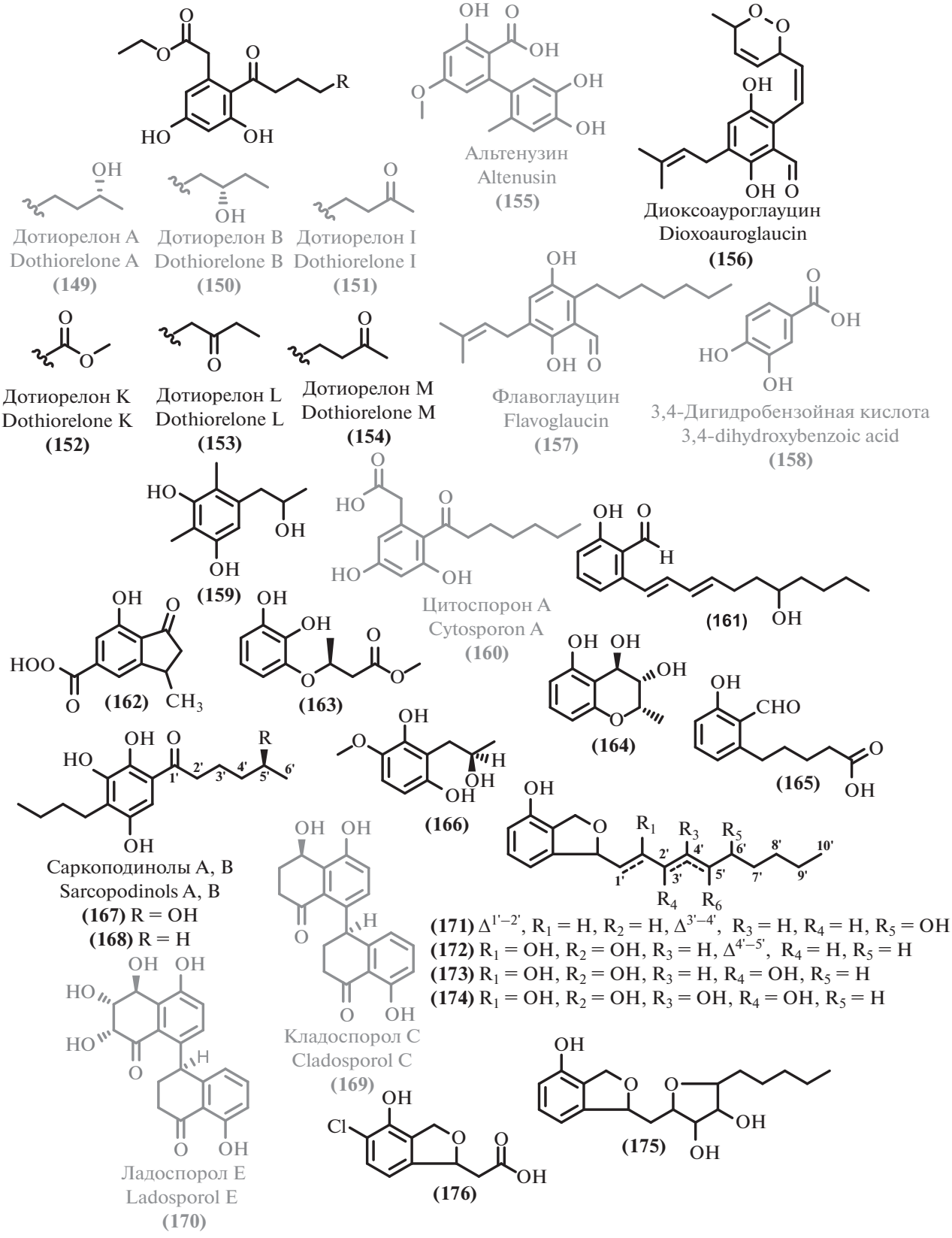


Рис. 11. Фенолы.

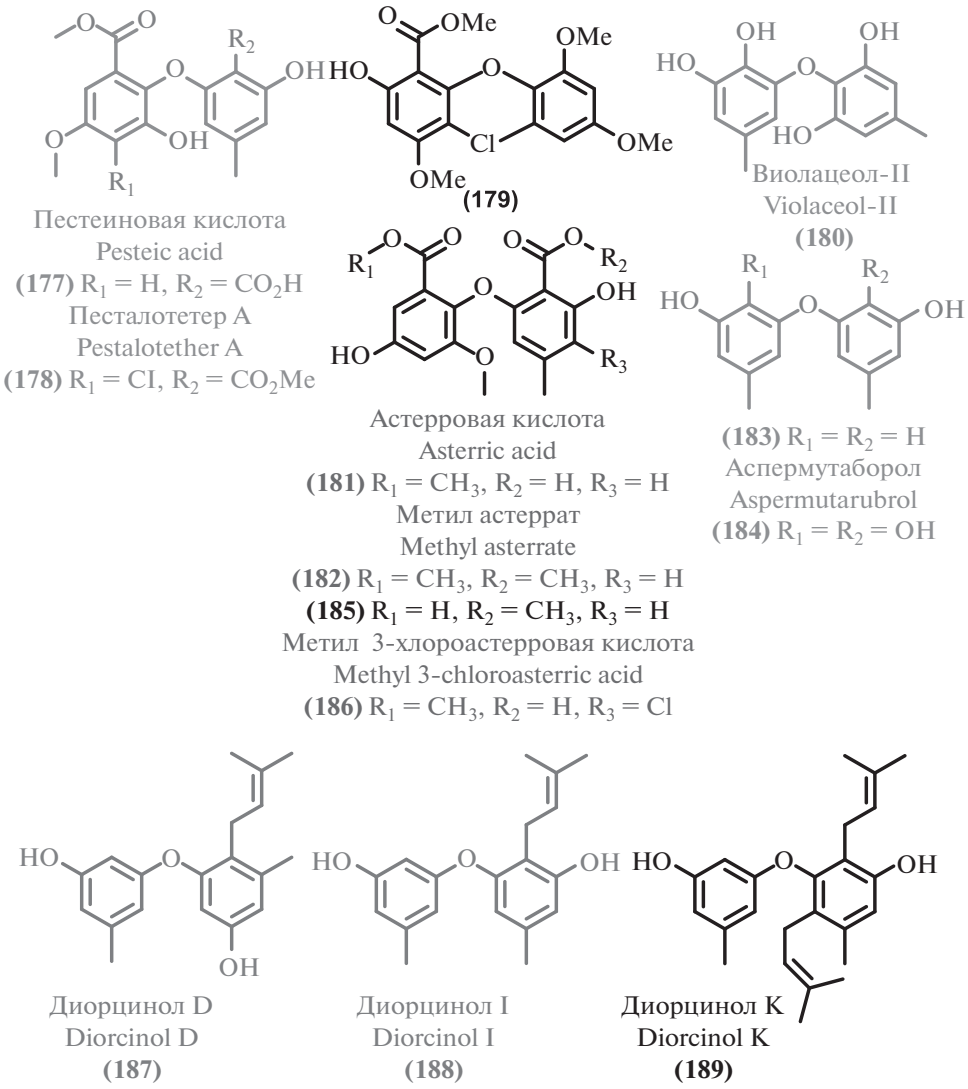


Рис. 12. Дифениловые эфиры.

Помимо фенолов, были выделены родственные дифениловые эфиры (рис. 12), из которых несколько соединений было новыми. Культивирование *Penicillium* sp. – симбионта морской губки – позволило выделить новый хлорированный дифениловый эфир (**179**) [176].

Остальные дифениловые эфиры оказались известными соединениями. Изучение вторичных метаболитов гриба рода *Pseudopestalotiopsis* [102] выявило описанные поликетиды: пестеивую кислоту (**177**) и песталотетер А (**178**) [177]. Донный гриб *Penicillium chrysogenum* MCCC 3A00292 [46] продуцирует серию известных антибиотических поликетидов различной природы 3,3'-дигидрокси-5,5'-диметилдифениловый эфир (**183**) [178], аспермутаборол (**184**), также известный как виолацеол I [179, 180], виолацеол II (**180**) [180, 181], аспердемин (**133**) [163]. Скрининг морских микромицетов на антибактериальную активность выявил штамм-продуцент шести известных метаболитов [74], в том числе и поликетида метил астеррата (**182**) [182, 183]. Соответствующая астерровая кислота (**181**) [184] была выделена из культуральной жидкости микромицета рода *Penicillium* мангрового происхождения [124]. Близкие по структуре новый (**185**) и три известных поликетида (астерровая кислота (**181**) [184], метил астеррат (**182**) [182, 183], метил-3-хлороастерровая кислота (**186**) [185]) были выделены из мангрового гриба рода *Pleosporales* [186]. Из них заметную активность проявило только известное соединение (**186**).

Новый антибактериальный дифениловый эфир диорцинол K (**189**) был выделен из морского микромицета *Aspergillus* sp. CUGB-F046 [187], наряду с известными активными аналогами диорцинолами D, I (**187**, **188**) [188, 189].

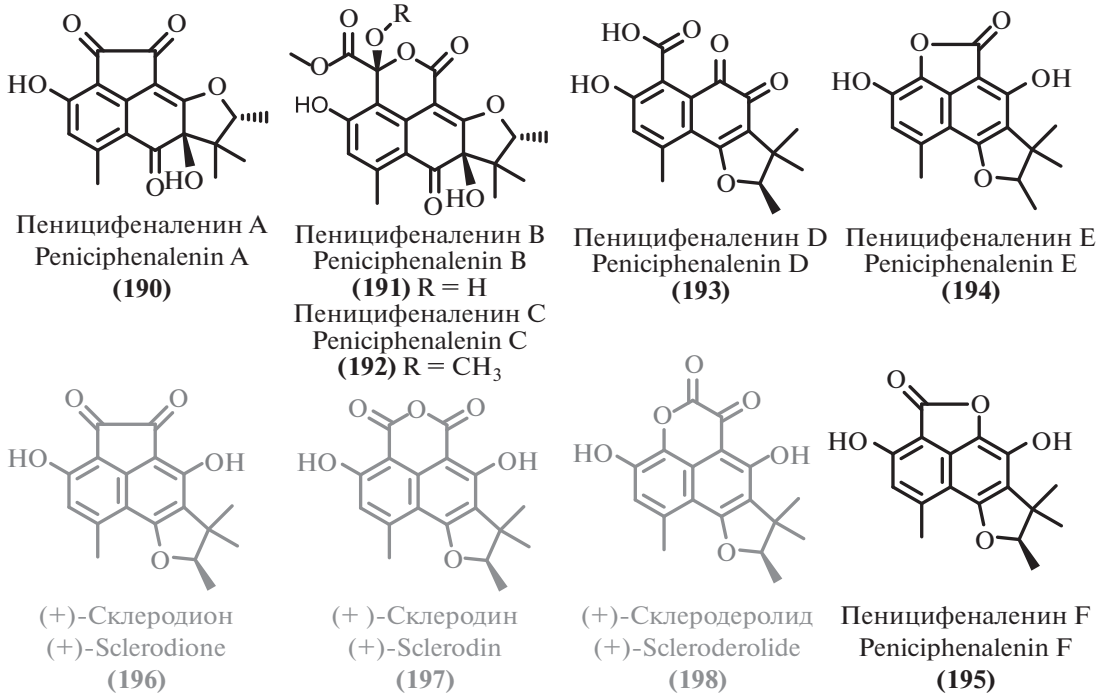


Рис. 13. Производные феналенона.

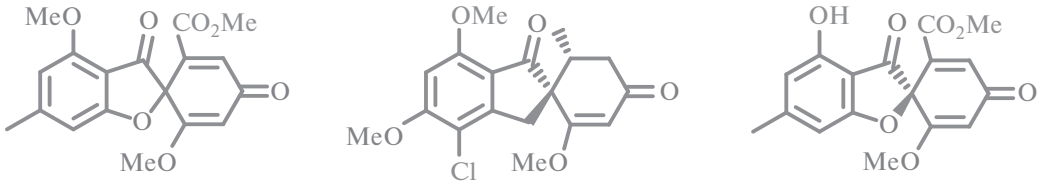


Рис. 14. Соединения гризанового типа.

Феналеноны представляют собой довольно редкий класс природных соединений [190]. При изучении морского гриба рода *Penicillium* [94] были выделены шесть ранее неописанных производных феналенона (рис. 13) – пеницифеналенины A–F (**190**–**195**), не проявившие антибиотической активности. При этом известные структурные аналоги (+)-склеродин (**197**) [191], (+)-склеродеролид (**198**) [192], (+)-склеродион (**196**) [193], проявили умеренную цитотоксичность.

Описанные спироциклические метаболиты с гризановым скелетом были обнаружены в качестве вторичных метаболитов экстремофильных микромицетов (рис. 14). Упомянутый выше продуцент ряда бензофенонов и антрахинонов [74] морского происхождения, наряду с упомянутыми соединениями, синтезирует (–)-бис-дехлорогеодин (**201**) [194]. Этот ранее описанный метаболит проявил антибактериальную активность и умеренную цитотоксичность. Культивирование симбионта морской губки рода *Penicillium* [176] привело к выделению известного спироциклического антифунгального антибиотика гризеофульвина (**200**) [131, 195].

Из штамма рода *Aspergillus* [75] был выделен трипацидин (**199**), ранее известный высокой цитотоксической активностью [196]. Для трипацидина была выявлена противотуберкулезная активность [75].

Азафилоны предстявляют собой распространенный класс ароматических вторичных метаболитов грибов, обладающих широким спек-

тром биологической активности [197]. Ряд представителей этого семейства, в том числе и новые галогенированные аналоги, был выделен из экстремофильных микромицетов (рис. 14). В рамках применения стратегии OSMAC, в среду для культивирования этого гриба рода *Penicillium* [176] добавили 5% NaBr, что позволило получить еще два бромированных азалофилона – бромофилоны A, B (**210**, **211**). Стереоизомеры (**210**) и (**211**) содержат уникальный для азалофилонов структурный мотив – ароматическую боковую цепь. Интересно, что бромофилон B (**211**) оказался заметно более цитотоксичен, чем его изомер бромофилон A (**210**).

Одновременно ряд структурно родственных азафилонов был выделен из другого гриба рода *Penicillium*, также морского происхождения [198]. Новые выделенные соединения, названные пеницилазафилонами D и E (**205**, **206**), не проявили заметной биологической активности. Ранее описанный (+)-склеротиорин (**207**) [199], напротив, продемонстрировал заметную противовирусную активность.

Еще одним источником галогенированных азафилонов оказался мангровый микромецет *Diaporthe* sp. SCSIO 41011 [200]. Из культуральной жидкости этого штамма были выделены шесть новых окисленных производных хлороазафилона, названных изохромофилонами A–F (**212**–**215**, **202**, **203**), наибольшую цитотоксическую активность проявил изохромофилон D (**215**). Наряду с новыми соединениями, был выделен ряд известных аналогов с антибиотической активностью: эпи-изохромофилон II (**204**) [200, 201] эпи-изохромофилон III (**216**) [201], изохромофилон III (**217**) [201]. Из почвенного мангрового продуцента *Penicillium pinophilum* SCAU037 [130] выделены известные азафилоны пинофилин B (**209**) [202] и Sch 725680 (**208**) [202, 203].

При изучении мангрового гриба рода *Cladosporium* [121] помимо новых соединений, был получен известный азафилоновый микотоксин цитринин H1 (**218**) [78, 204], представляющий собой спироциклический азафилон. Похожие соединения были получены из гриба морского происхождения [108]: был выделен новый поликетид ксеруцитринин A (**219**), ксеруцитриновая кислота A (**220**) [205], пеницитриноны A (**221**), F (**222**) [206].

Среди вторичных метаболитов экстремофильных микромицетов было обнаружено существенное число поликетидов линейного строения или содержащих длинные слаборазветвленные фрагменты, в том числе полиненасыщенные (рис. 16).

В результате системного скрининга морских микроорганизмов на антибактериальную активность был обнаружен штамм рода *Aspergillus* [75], продуцирующий сфингофунгин I (**239**), наряду с известными поликетидами, в том числе близким по структуре сфингофунгином D (**240**) [207]. Из гриба *Penicillium janthinellum* [208] были получены два новых гликозилированных алкилрезорцина – резорцинозиды A и B (**244**, **245**) – первые представители структурного семейства резорцинолов, гликозилированные по алкильной, а не ароматической части молекулы. Замещенный резорцинол B (**245**) проявил выраженную цитотоксичность по отношению к целому ряду клеточиных линий, в том время как резорцинол A (**244**) практически неактивен ($GI_{50} > 50$ μM). Из культуральной жидкости штамма штамма *Aspergillus porosus* [209] морского происхождения были получены новые поликетидные метаболиты поросуфенолы A–D (**234**, **235**, **237a**, **b**). Два последних вещества при обычных условиях находятся в динамическом равновесии (линейная **237a** и циклическая **237b** формы). Психрофильный микромицет, выделенный из Антарктического региона, вида *Penicillium crustosum* HDN153086 [40] оказался продуцентом нового полиенового соединения необычной структуры (**238**), не проявивший биологической активности. Еще один известный линейный поликетид радиклоновая кислота (**236**) [210] был выделен из донного гриба *Penicillium chrysogenum* MCCC 3A00292 [46].

Мангровый микромицет рода *Fusarium solani* H918 [211], наряду с известным антибиотиком 1233B (**241**) [212], продуцирует серию ранее неописанных поликетидов, названных фузаризолинами A–E (**242**, **243**, **229**–**231**). Несмотря на отсутствие выраженной антибиотической активности, в молекулах этих соединений содержатся редкие структурные мотивы, такие как β- и γ-лактонные циклы в фузаризолинах A (**242**) и B (**243**) соответственно. Другой мангровый эндофит *Cladosporium* sp. [116] стал источником линейных поликетидов (**232**, **233**).

Совместное культивирование двух микромицетов экстремофильного происхождения привело к необычному спектру биоактивных вторичных метаболитов. Из совместной культуры глубоководного гриба *Penicillium crustosum* PRB-2, выделенного из Антарктики, и мангрового гриба *Xylaria* sp. HDN13-249 [213] были выделены четыре новых алкилароматических поликетида, названные пениксиларинами A–D (**223**–**226**), а также два известных [214] биосинтетических аналога: 5-(12-гидроксигептадецил)резорцин (**227**) и 5-(12-сульфогептадецил)резорцин (**228**). Следует отметить, что соединения (**223**) и (**224**) биосинтезируются только при совместном культивировании двух продуцентов, в то время как метаболиты (**225**–**228**) могут производится монокультурой *Xylaria* sp., но в существенно меньших количествах.

Структуры прочих поликетидных вторичных метаболитов приведены на рис. 17, некоторые из которых были описаны впервые. Так, помимо но-

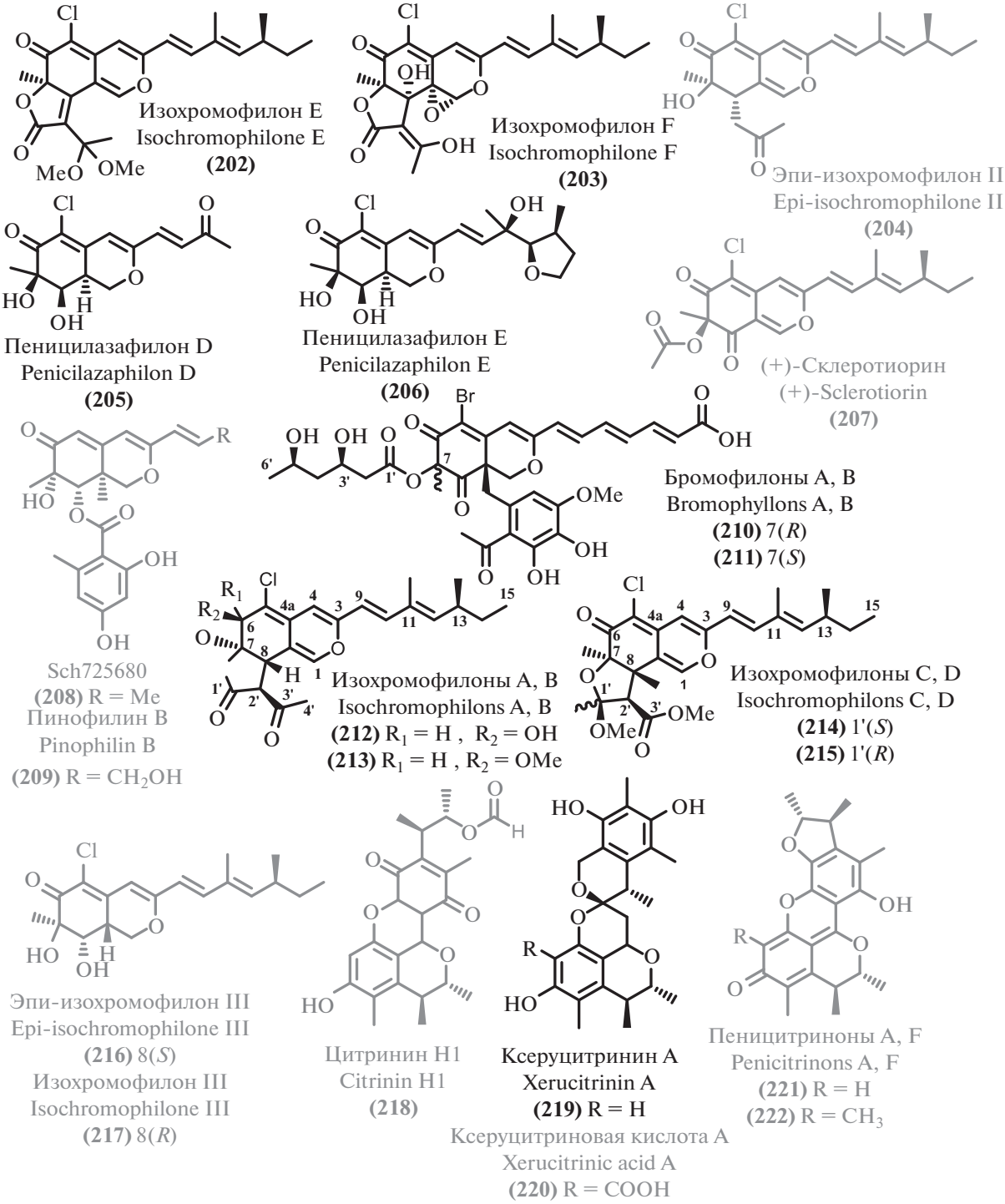


Рис. 15. Азафилоны.

вых галогенированных азафилонов культивирование симбионта морской губки рода *Penicillium* [176] привело к выделению известного микотоксина пенициллиновой кислоты (**249**) [215–218]. Серия производных пенициллиновой кислоты была выделена также из морского микромицета [42]. В соответствии со стратегией OSMAC, было проведено совместое культивирование этого микромицета с *Bacillus subtilis*. В результате получены два новых производных пенициллиновой кислоты – охраспердилловые кислоты A и B (**253**, **254**). Кроме того, была выделена и сама пенициллиновая кислота (**249**).

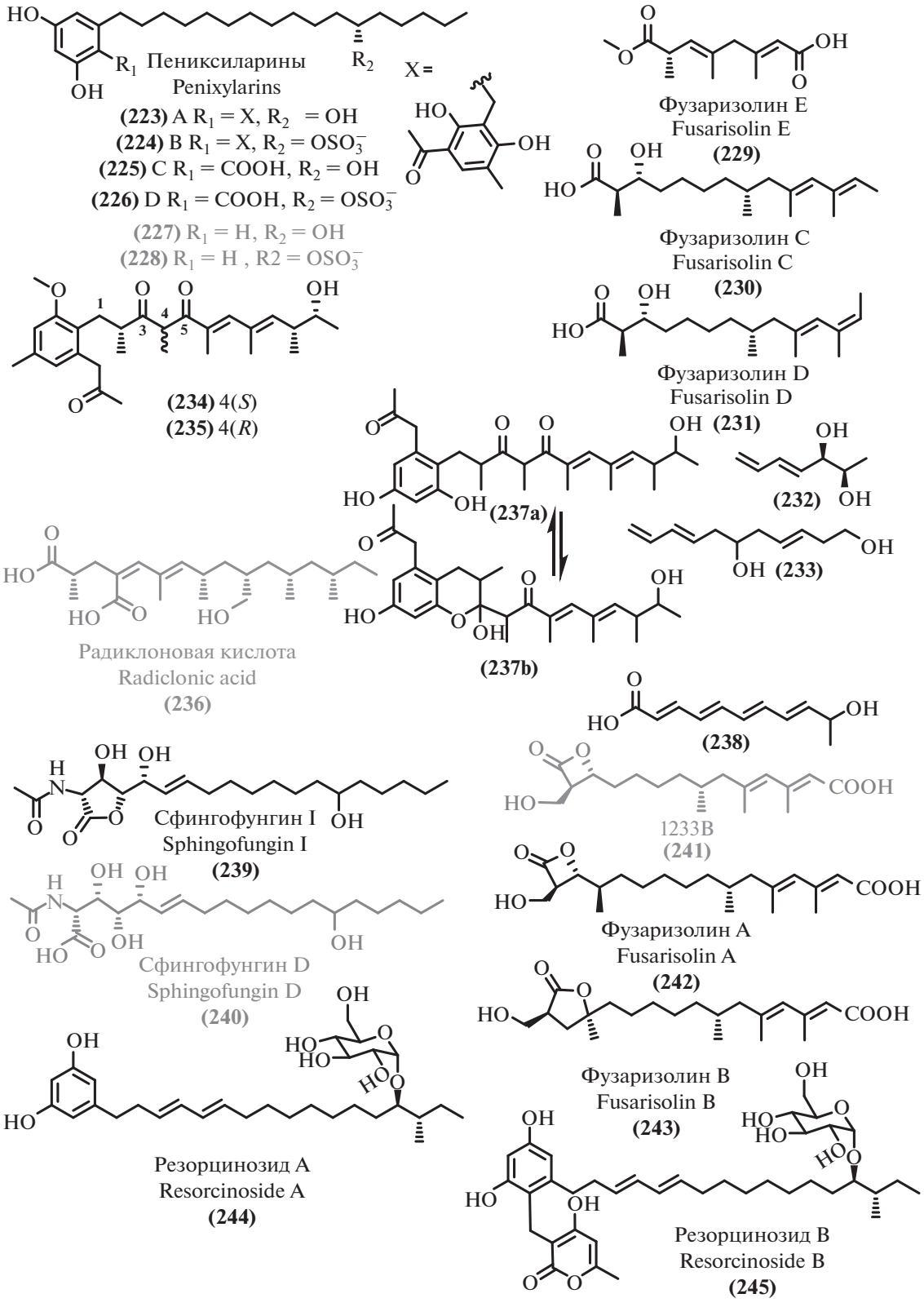


Рис. 16. Линейные поликетиды.

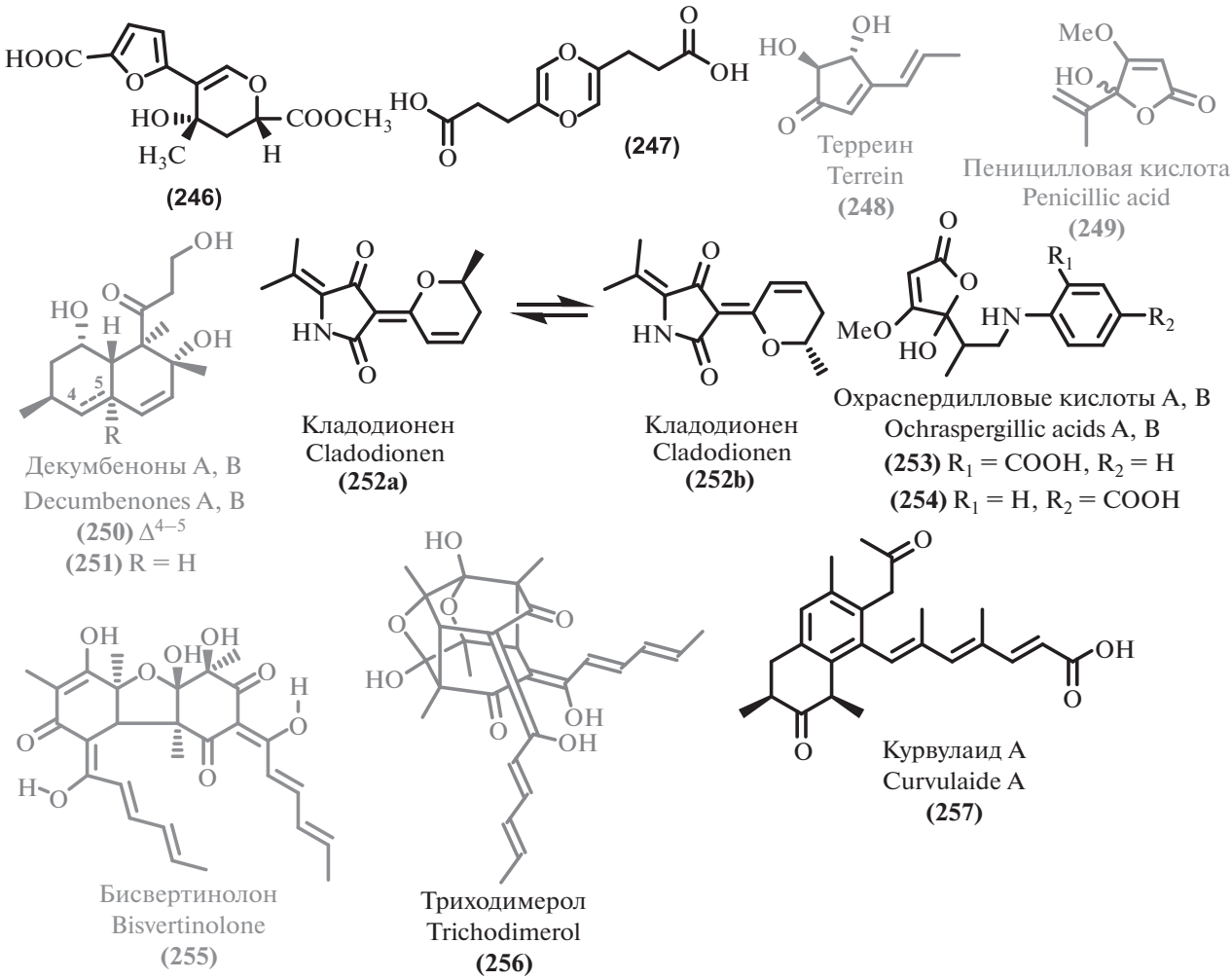


Рис. 17. Прочие поликетиды.

Из морского микромицета рода *Curvularia* sp. был выделен новый макролид, названный курвуларидом A (**257**) [219], проявивший умеренную антибактериальную активность и цитотоксичность. Новый гибридный поликетид, названный кладионеном (**252**) [220], был выделен из другого гриба морского происхождения *Cladosporium* sp. OUCMDZ-1635. Кладионен (**252**) при нормальных условиях представляет собой равновесную смесь двух геометрических изомеров (**252a**, **252b**). Кладионен (**252**) проявил выраженную цитотоксическую активность.

Разделение на основании биоактивности экстракта культуральной жидкости термофильного микромицета рода *Penicillium* [73], выделенного из горячих источников в Саудовской Аравии, привело к получению нового поликетида (**246**).

При изучении мангрового гриба рода *Cladosporium* [121] была получена новая активная 1,1'-диоксин-2,2'-дипропионовая кислота (**247**).

Был выделен также ряд известных антибиотиков различного строения. В том числе, из донного микромицета [59] был выделен триходимерол (**256**) [221]. Из морского психротолерантного гриба *Aspergillus protuberus* [222], отобранного в результате скрининга серии культивируемых полиэкстремофильных микроорганизмов Баренцева моря на антибактериальную активность, был выделен бисвертинолон (**255**), известный антибактериальный поликетид группы сорбициллоноидов [223].

Донный гриб *Penicillium chrysogenum* МССС 3A00292 [46] продуцирует известные метаболиты декумбеноны A, B (**250**, **251**) [224], которые были изучены в качестве цитотоксических агентов.

Изучение ряда изолятов микромицетов морского происхождения позволило выделить продуцент известного антибиотика терреина (**248**) [131, 225], обладающий высокой продуктивностью [226]. Отбор штаммов проводился на основе скрининга антимикробной и цитотоксической активности изолятов.

Таблица 4. Данные о происхождении и биологической активности поликетидов различных структурных типов

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
257	*Curvularia* sp.	Морской	CT AB	**IC_{50} 12.46 μM** (BEL7402/5-Fu) **MIC 62.5 μM** (*P. gingivalis*)	[219]
161	*Zopfiella marina*	Морской	AT AB CT	**MIC 25 μg/mL** (*M. tuberculosis* H37Ra) **MIC 12.5 μg/mL** (*B. cereus*) **IC_{50} 13.6 μg/mL** (Vero)	[164]
199 **240**	*Aspergillus fumigatus* MF029	Морской	AB AT AF	**MIC 50, 50, 12.5, 1.25 μg/mL** (MRSA, *S. aureus*, *B. subtilis*) **MIC 1.25 μg/mL** (BCG) **MIC 8, 32, 8, 16 μg/mL** (*Cryptococcus neoformans* MY 1051, *C.neoformans* MY 1146, *C. neoformans* MY 2061, *C. neoformans* MY 2062) [207] **MIC 128 μg/mL** (*C. albicans* MY 1028, MY 1055, MY 1750) [207] **MIC 128, 16, 128, 128 μg/mL** (*C. parapsilosis* MY 1010, *C. pseudotropicalis* MY 2099, *C. tropicalis* MY 1012, *S. cerevisiae* MY 1976) [207] **MIC 64 μg/mL** (*A. flavus* MF 383)	[75]
201	*Aspergillus* sp.	Морской	AB CT	**MIC 15.15, 30.30, 7.53 μM** (*V. anguillarum*, *A. salmonicida*, *P. aeruginosa*) **IC_{50} 3.56 – 10.69 μM** (Jurkat, A549, HeLa)	[74]
248	*Aspergillus terreus* S020	Морской	CT	**IC_{50} 12.13, 22.53 μM** (HCT-116, HepG2) **IC_{50} 1.1–66.8 μM** (MCF-7, PANC-1, HepG2) [131]	[226]
111 **112** **155** **126** **113** **127** **147**	*Alternaria* sp. SCSIO41014	Морской	CT AB	**EC_{50} 1.7 μg/mL** (L5178Y) [143] **EC_{50} 7.8 μg/mL** (L5178Y) [143] **EC_{50} 6.8 μg/mL** (L5178Y) [143] **EC_{50} 0.67 μM** (Soybean cell) [147] **MIC 45 μg/mL** (*S. aureus* ATCC 25923) [146] **IC_{50} 85.4 μM** (FabI *S. aureus*) [144] **MIC 8–32 μg/mL** (*S. aureus* RN4220, *S. aureus* (MRSA) CCARM, *S. aureus* (QRSA) CCARM 3505, *B. cereus* KCTC 1661) [144] **Качественная АВ активность** (*S. aureus* ATCC 29213, *Bacillus subtilis* ATCC 6051) [148] **MIC 31.25 μg/mL** (*S. aureus*) **MIC 17.1 μg/mL** (*C. albicans* ATCC 24433) [146] **MIC 35.5 μg/mL** (*Trichophyton rubrum* 28189) [146] **EC_{50} 10 μg/mL** (L5178Y) [143]	[87]
196 **197** **198**	*Penicillium* sp. ZZ901	Морской	CT AB	**IC_{50} 60.93 μM** (клетки глиомы U87MG) **IC_{50} 60.81 μM** (клетки глиомы C6) **MIC 23, 35 μg/mL** (MRSA, *E. coli*) **IC_{50} 55.99 μM** (клетки глиомы U87MG) **IC_{50} 44.65 μM** (клетки глиомы C6) **IC_{50} 37.26 μM** (клетки глиомы U87MG) **IC_{50} 23.24 μM** (клетки глиомы C6) **MIC 7, 9 μg/mL** (MRSA, *E. coli*)	[94]

Таблица 4. Продолжение

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
207	*Penicillium sclerotiorum* GDST-2013-0415	Морской	AV	**IC_{50} 19.5–132 μM** (HSV, EV71, RSV1)	[198]
210	*Penicillium canescens*	Морской	CT AF AB	**IC_{50} 13.9 μM** (L5178Y)	[176]
211				**IC_{50} 2.7, 8.9 μM** (A2780, L5178Y)	
200				**IC_{50} 20, 35 μM** (HeLa, SCC-114) [131] **IC_{50} 11.6 μg/mL** (*C. gloeosporioides*) [195] **IC_{50} 2.68 μg/mL** (*A. solani*) [195]	
249				**IC_{50} 8.9 μM** (L5178Y) **IC_{50} 7.8–29.4 μM** (POS1, AT6-1, L929) [217] **MIC 111.1 μg/mL** (*Agrobacterium tumefaciens, Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis, Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum, Pseudomonas syringae pv. Actinidae, Xanthomonas arboricola pv. Pruni, X. axonopodis pv. citri*) [218] **MIC 37 μg/mL** (*Acidovorax avenae subsp. cattlyae, Burkholderia glumae, X. euversicatoria, Streptomyces scabies*) [218] **MIC 12.3 μg/mL** (*X. oryzae pv. oryzae*) [218]	
212	*Diaporthe* sp. SCSIO 41011	Мангровый	CT AP	**IC_{50} 27–45 μM (**ACHN, 786-O, -RC-2)	[200]
214				**IC_{50} 38, 44 μM (**786-O, OS-RC-2)	
215				**IC_{50} 8.9–14 μM (**ACHN, 786-O, OS-RC-2)	
204				**IC_{50} 10–38 μM (**ACHN, 786-O, OS-RC-2)	
216				**IC_{50} 48, 4.9 μM (**786-O, OS-RC-2) **IC_{50} 6.2–10.6 μg/mL (**KB, NCI-H187, MCF-7) [201] **IC_{50} 7.8 μg/mL** (*Plasmodium falciparum*) [201]	
217				**IC_{50} 8.5–30.2 μg/mL (**KB, NCI-H187, MCF-7) [201]	
205				**IC_{50} 3.0–4.4 μM (**ACHN, 786-O, OS-RC-2)	
145	*Penicillium purpurogenum* G59	Морской	CT	**IC_{50} 124.3, 329.9 μM** (HL-60, K562)	[159]
177	*Pseudopestalotiopsis* sp. PSU-AMF45	Морской	AF	**MIC 200 μg/mL** (*Cryptococcus neoformans* ATCC90112)	[102]
178				**MIC 200 μg/mL** (*Cryptococcus neoformans* ATCC90112)	
136				**IC_{50} 0.01 μM** (HEP-G2) [154]	
245	*Penicillium janthinellum*	Морской	CT	**GI_{50} 9.3–31 μM** (NUGC-3, HCT-15, NCI- H23, ACHN, PC-3, MDA-MB-231)	[208]
139	*Curvularia sp.* IFB-Z10	Морской	CT	**IC_{50} 9.85, 2.46 μM** (BEL7402, BEL7402/5-FU)	[155]
124	*Penicillium piltunense* KMM 4668	Морской	CT AF	**IC_{50} 71.74 μM** (22Rv1)	[151]
125				**IC_{50} 30 μM** (*P. viticola*)	

Таблица 4. Продолжение

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
252	*Cladosporium* sp. OUCMDZ-1635	Морской	CT	**IC_{50} 9.1–19.1 μM (**MCF-7, HeLa, HCT-116, HL-60)	[220]
255	*Aspergillus protuberus* MUT 3638	Морской	AB	**MIC 30 μg/mL** (*S. aureus*)	[222]
148	*Colletotrichum gloeosporioides*	Мангровый	AB	**MIC 25, 12.5, 12.5, 12.5 μg/mL** (*B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. albus*)	[113]
166				**MIC 25 μg/mL** (*B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*)	
154	*Dothiorella* sp. ML002	Мангровый	AB CT AV	**MIC 50 μg/mL** (*S. aureus*)	[165]
151				**MIC 50 μg/mL** (*S. aureus*)	
149				**IC_{50} 25–30 μg/mL** (HEp-2, HepG2) [166]	
153				**MIC 50 μg/mL** (*S. aureus*)	
160				**IC_{50} 436–>600 μg/mL (***S. epidermidis, E. coli, P. aeruginosa, M. smegmatis*) [168]	
150				**MIC 500 μg/mL** (TMV) [227]	
121	*Pestalotiopsis* sp.	Мангровый	AB	**MIC 12.5, 50 μg/mL** (*E. coli*, *P. aeruginosa*)	[145]
116	*Ascomycota* sp. CYSK-4	Мангровый	AB AF CT	**MIC 50 μg/mL** (*S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*)	[136]
119				**MIC 25, 25, 25, 25, 50 μg/mL** (*S. aureus, B. subtilis, E. coli, K. pneumoniae*, *Acinetobacter calcoaceticus*)	
120				**MIC 25 μg/mL** (*S. aureus*, *B. subtilis*) **MIC 25–50 μg/mL** (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter calcoaceticus*) **MIC 150 μg/mL** (*R. solani*)	
115				**IC_{50} 17.8 μg/mL** (MCF-7) [137] **IC_{50} 39.6 μg/mL** (HepG2) [137]	
134	*Lasiodiplodia theobromae* M4.2-2	Мангровый	CT AB	**MIC 25, 25, 25 μg/mL** (*S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 700699 и *E. faecium* ATCC 35667)	[156]
140				**IC_{50} 7.3 μM (**L5178Y)	
142				**IC_{50} 96.97 μM (**HeLa) [157] **GI_{50} 1.67 μM (**HUVEC) [157] **GI_{50} 0.84 μM (**K-562) [157] **MIC 26.03, 191.60 μM** (*A. terreus*, *F. oxysporum*) [157]	
143				**IC_{50} 36.41 μM (**HeLa) [157] **GI_{50} 0.07 μM (**HUVEC) [157] **GI_{50} 0.003 μM (**K-562) [157] **MIC 49.7, 238.8 μM** (*A. terreus*, *F. oxysporum*) [157]	
118	*Phyllosticta capitalensis*	Мангровый	AB	**MIC 25 μg/mL** (*P. aeruginosa*)	[141]
158				**MIC 25 μg/mL** (*P. aeruginosa*)	

Таблица 4. Продолжение

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
247	*Cladosporium* sp. JS1-2	Мангровый		**MIC 25, 25, 12.5 μg/mL** (*S. aureus, E. coli, B. cereus*)	
170			AB CT	**MIC 1.56, 12.5 μg/mL** (*S. aureus*, *M. luteus*)	[121]
169				**MIC 6.25, 12.5 μg/mL** (*S. aureus*, *M. luteus*) **MIC 8–32 μg/mL** (*E. coli, V. harveyi, M. luteus*) [173] **IC_{50} 4–14 μM** (H446, A549) [173]	
218	*Penicillium* sp. ZZ380 *Cladosporium* sp. JS1-2	Морской Мангровый	AB	**MIC 6.25, 12.5, 12.5 μg/mL** (*S. aureus*, *E. coli, B. cereus*)	[78] [121]
208	*Penicillium pinophilum* SCAU037	Мангровый	AB AF CT	**IC_{50} 23.5, 2.6 μM** (*M. smegmatis*, *S. aureus*) **MIC 64 μg/mL** (*S. aureus*) [203] **MIC 8–64 μg/mL** (*S. cerevisiae* PM503, *C. albicans* C43) [203]	
138				**IC_{50} 6.7–7.8 μM** (Hep-2, RD) [161]	[130]
209				**IC_{50} 62–68.8 μM** (A549, BALL-1, HCT116, HeLa, NUGC-3) [202] **IC_{50} 90.4–99 μM** (A549, BALL-1, HCT116, HeLa, NUGC-3) [202]	
157	*Aspergillus* sp. AV-2	Мангровый	CT	**IC_{50} 2.87 μM (**Caco-2)	[170]
241	*Fusarium solani* H918	Мангровый	AF	**ED_{50} 55 μM (***P. theae*)	[211]
128	*Cladosporium cladosporioides* MA-299	Мангровый		**MIC 2 μg/mL** (*C. glecosporioides*) **MIC 1, 8 μg/mL** (*Edwardsiella tarda*, *E. ictarda*)	
129				**MIC 2, 8 μg/mL** (*C. glecosporioides*, *Bipolaris sorokiniana*)	
130				**MIC 2 μg/mL** (*C. glecosporioides*) **MIC 32 μg/mL** (*P. piricola Nose*) **MIC 1 μg/mL** (*Fusarium oxysporum f.* sp. *cucumerinum*)	
131			AB AF	**MIC 1 μg/mL** (*C. glecosporioides*) **MIC 32 μg/mL** (*P. piricola Nose*) **MIC 32 μg/mL** (*Fusarium oxysporum f.* sp. *cucumerinum*)	[152]
132				**MIC 1 μg/mL** (*E. ictarda*) **MIC 1 μg/mL** (*C. glecosporioides*) **MIC 32 μg/mL** (*P. piricola Nose*) **MIC 32 μg/mL** (*Fusarium oxysporum f.* sp.*cucumerinum*)	

Таблица 4. Продолжение

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
224 **225** **227** **228**	Совместное культивирование *Penicillium crustosum* PRB-2 и *Xylaria* sp. HDN13-249	Антарктида Мангровый	AB	**MIC 100 μM (***B. subtilis***)** **MIC 6.25, 12.5 μM** (*M. phlei*, *V. parahemolyticus*) **MIC 25 μM** (*M. phlei*) **MIC 12.5, 25 μM** (*M. phlei*, *V. parahemolyticus*)	[213]
246 **162**	*Penicillium* sp. RO-11	Отложения горячего источника (45–65°C), Саудовская Аравия/Термофил	AB CT	**MIC 9.3, 7.4 μg/mL** (*Enterobacter xiangfangensis*, *P. aeruginosa*) **MIC 6.3, 5.7 μg/mL** (*Escherichia fergusonii*, *P. aeruginosa*) **IC_{50} 22 μM (**HTB-176)	[73]
167 **168**	*Sarcopodium* sp. FKJ-0025	Глубоководный 200 м	CT	**IC_{50} 47 μg/mL (**Jurkat) **IC_{50} 37–66 μg/mL (**Jurkat, HL-60, Panc1)	[169]
233	*Cladosporium* sp. OUCMDZ-302	Мангровый	CT	**IC_{50} 10 μM (**H1975)	[116]
236	*Penicillium chrysogenum* MCCC 3A00292	Глубоководный 2076 м	CT	**IC_{50} 7.70–13.75 μM (**BIU-87, ECA109, BEL-7402)	[210]
183 **184** **180** **133**	*Penicillium chrysogenum* MCCC 3A00292	Глубоководный 2076 м	CT AB AF	**IC_{50} 16.41 μM (**BIU-87) **MIC 200 μg/mL** (*E. coli*) [179] **MIC 50–200 μg/mL** (*B. subtilis, S. aureus, M. lysodeikticus*) [179] **MIC 19.531 μg/mL** (*S.aureus, S. saprophyticus*, MRSA) [180] **MIC 19.531, 156.25, 78.125 μg/mL** (*B. subtilis, B. cereus*, *Salmonella thyphimurium*, *Shigella sonneii*) [180] **IC_{50} 9.95 μM (**ECA109) **MIC 39.062, 78.125, 39.062, 312.5 μg/mL** (*S.aureus*, MRSA, *B. subtilis, B. cereus*, *Salmonella thyphimurium, Shigella sonneii*) [180] **MIC ˂9.765 μg/mL** (*C. albicans*) [180] **IC_{50} 12.95 μM (**BEL-7402)	[46]
182	*Aspergillus* sp. *Pleosporales* sp. SK7	Морской Мангровый	CT	**IC_{50} 30.2–45 μg/mL (**HepG2, HL-60, MOLT-3) [182]	[74] [186]
250 **251**	*Penicillium chrysogenum* MCCC 3A00292	Глубоководный 2076 м	CT	**IC_{50} 12.49 μM (**ECA109) **IC_{50} 15.6 μM (**ECA109)	[46]

Таблица 4. Окончание

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
122 **256** **146**	*Penicillium* sp. SCSIO 06720	Глубоководный 4762 м	CT AF	**IC_{50} 18.9 μg/mL** (K562) [149] **MIC 32, 32, 64 μg/mL** (*P. oryzae*, *C. albicans*, *A. niger*) [221] **Качественная AF активность** (*C. albicans, T. harzianum*) [162]	[59]
181	*Penicillium citrinum* HL-5126	Мангровый	AB CT	**IC_{50} 21.6 μg/mL (**HeLa)	[124]
219 **220** **221** **222**	*Penicillium citrinum* SCSIO 41017	Морской	CT AB AV	**IC_{50} 13.0–49.3 μM (**SF-268, MCF-7, HepG-2, A549) **IC_{50} 16.1–55.4 μM (**SF-268, MCF-7, HepG-2, A549) **MIC 12.5 μg/mL** (*B. cereus*) [205] **IC_{50} 1.3–47.9 μM (**SF-268, MCF-7, HepG-2, A549) **IC_{50} 16.41–115.3 μM (**SF-268, MCF-7, HepG-2, A549) **IC_{50} 14.5 μM (**EV71) [206]	[108]
137	*Penicillium citrinum* SCSIO 41017 *Aspergillus sydowii* C1-S01-A7	Морской Глубоководный 4950 м	AB	**MIC 32.4 μg/mL** (MR *S. aureus* ATCC 43300, MR *S. aureus* CGMCC) [77]	[108] [77]
186	*Pleosporales* sp. SK7	Мангровый	CT	**IC_{50} 25.96 μM** (MDA-MB-435)	[186]
189 **187** **188**	*Aspergillus* sp. CUGB-F046	Морской	AB CT AF	**MIC 3.125 μg/mL** (*S. aureus*, MRSA) **MIC 6.25 μg/mL** (*S. aureus*, MRSA) **IC_{50} 31.5–48.9 μM** (HeLa, K562) [188] **IC_{50} 23.2–36.3 μM** (PC3, A549, A2780, MDA-MB231, HEPG2) [189] **MIC 32.0 μg/mL** (*C. albicans*) [189] **MIC 6.25 μg/mL** (*S. aureus*, MRSA) **IC_{50} 29.8–31.6 μM** (PC3, HEPG2) [189] **MIC 8.0 μg/mL** (*C. albicans*) [189]	[187]

3. АЛКАЛОИДЫ

При изучении экстремофильных микромицетов было выделено более семидесяти гетероциклических соединений, которые можно отнести к алкалоидам.

Выраженную антибактериальную активность и цитотоксичность проявил новый биосинетический аддукт двух известных фунгальных метаболитов GKK1032B (**258**) [228] с производным фенола A, названный пенициприродиэфиром A (**259**) [229]. Интересно, что GKK1032B (**258**) был выделен и из другого морского микромицета *Penicillium erubescens* KUFA0220 [114, 230] и также оказался наиболее активным антибиотическим вторичным метаболитом из перечисленных. Из морского гриба *Penicillium* sp. ZZ380 [78] были выделены 7 новых пирроспиронов C–I (**260–268**), имеющих похожее строение. При этом разница в биологической активности выделенных пирроспиронов существенна. Так, выраженной цитотоксичностью в отношении 4 клеточных линий обладает только пирроспирон G (**266**). Антибактериальную активность, в том числе в отношении резистентных грамположительных и грамотрицательных бактерий, проявляют пирроспироны C (**260**), F (**264**), I (**267**).

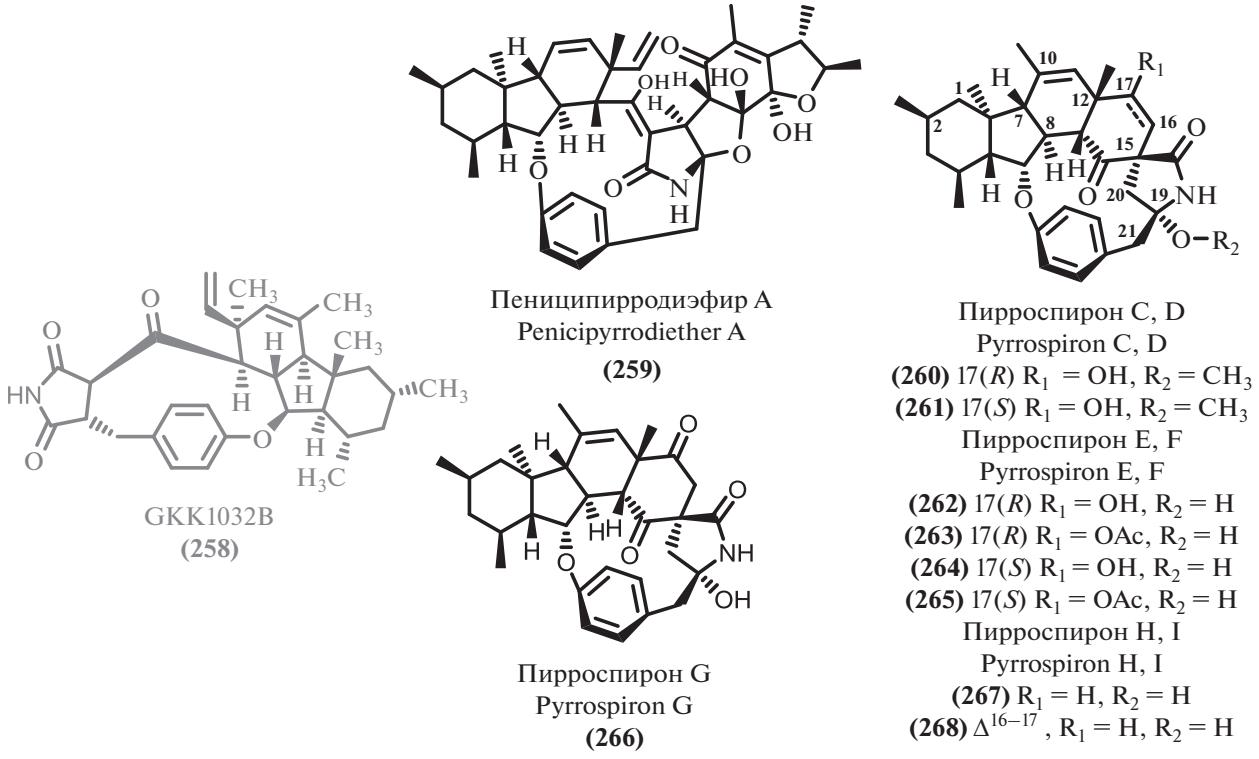


Рис. 18. GKK1032B, пенициpирродиэфир A и пирроспироны C-G.

Экстремофильные микромицеты стали источником ряда алкалоидов, содержащих индоловое ядро и его производные (рис. 19, 20).

Алкалоиды индол-дитерпенового типа (рис. 19) были выделены из микромицетов различного происхождения. Морской гриб рода *Aspergillus* [231] стал источником четырех новых алкалоидов индол-дитерпенового типа, названных асперидолами A–D (**279**–**282**), только один из которых проявил цитотоксическую активность (**279**). При изучении штамма *Tolypocladium* sp. XL115 [232], выделенного из почвы угольной шахты, были получены десять новых пренилированных дитерпеновых алкалоидов, названных толипокладинами A–J (**269**–**278**), два из которых проявили существенную противомикробную активность (**269**, **276**).

Структуры прочих индоловых алкалоидов обобщены на рис. 20. Два новых алкалоида 4-эпи-секо-шортфинововую кислоту A (**300**) и ее метиловый эфир (**299**), наряду с известным биосинтетически связанным аналогом шорфернином A (**303**) [233], содержащим редкий дикетоморфолиновый мотив, были выделены из эндофита морских водорослей [234].

Ранее неописанные алкалоиды, кандидусин D (**296**) и преуссин C (**329**) были выделены из морского гриба *Aspergillus candidus* KUFA0062 [79] вместе с родственными соединениями, из которых только петромурин C (**295**) [235] и преуссин (**328**) [236] ранее проявляли заметную активность. Прочие соединения демонстрировали слабую цитотоксичность: диметиловый эфир астериквинола D (**296**), кумбицины A, B, D (**327**, **298**, **304**) [235].

Глубоководный микромицет *Aspergillus fumigatus* SCSIO 41012 [237] оказался источником большого числа антибиотических вторичных метаболитов. Были выделены два новых алкалоида, названные фумигатозидом E (**283**) и F (**284**), наряду с их ранее описанными структурными аналогами фумикиназолинами C (**285**) и G (**286**) [238]; эпиасзоналенином A (**288**) [239].

Интересным примером, помимо вышеупомянутого [213], успешного применения совместного культивирования для диверсификации спектра вторичных метаболитов микромицетов является выделение пяти новых индоловых алкалоидов: 17-гидроксинотоамида D (**287**), 17-*O*-этилнотоамида M (**292**), 10-*O*-ацетилсклеротиамида (**289**), 10-*O*-этилсклеротиамида (**290**) и 10-*O*-этилнотоамида R (**293**) при совместном культивировании двух морских микромицетов [240].

Изучение взаимосвязи стурктуры и цитотоксической активности нового индольного алкалоида миссзртина A (**291**), выделенного из морского

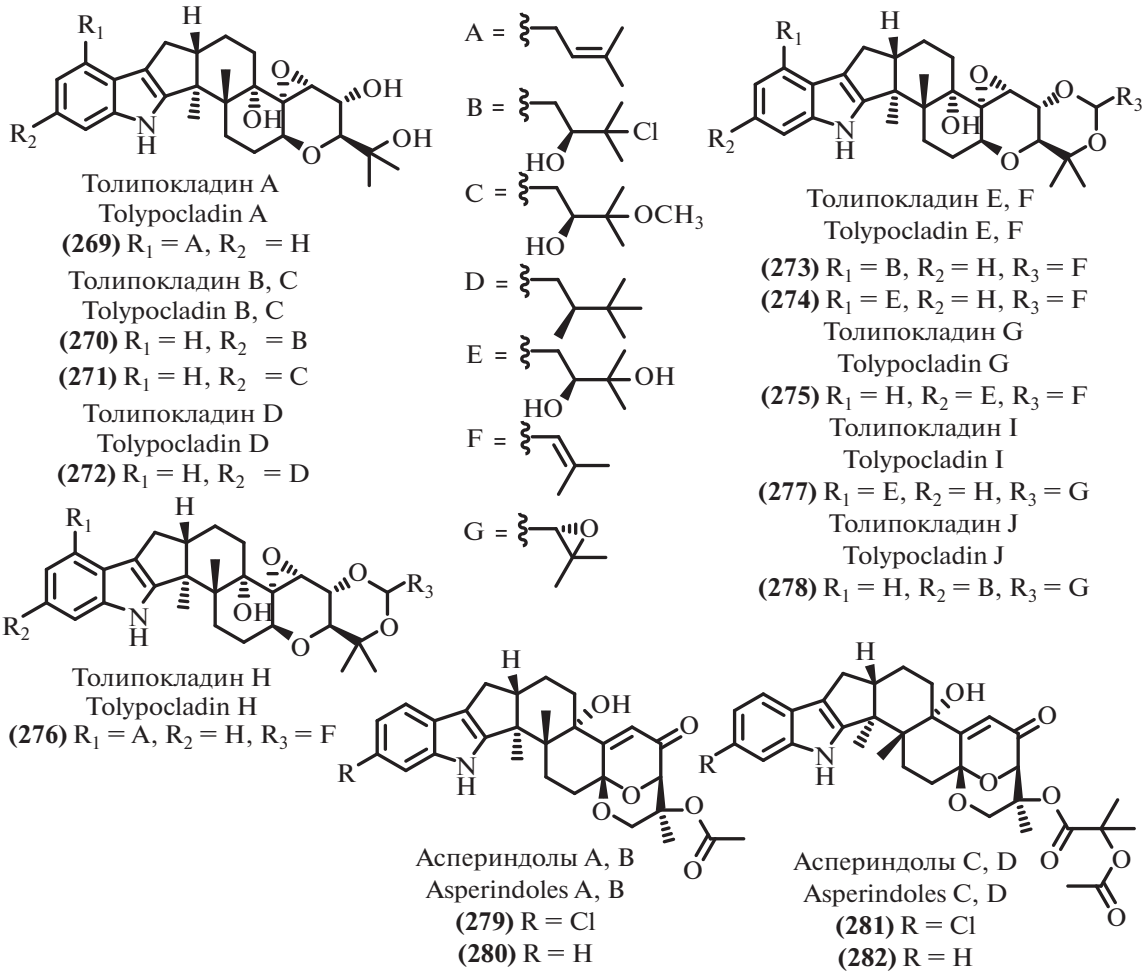


Рис. 19. Толипокладины и асперидолы.

Aspergillus sp. SCSIO XWS03F03 [241], показало существенное влияние функционализации индольного азота на реализацию биологических свойств.

Оригинальные индольные дитерпены, пеницилиндолы A–C (**305**–**307**), были выделены из мангрового гриба *Eupenicillium* sp. HJ002 [242]. Пенициллиндолы A (**305**) и B (**306**), не содержащие дополнительного цикла, проявили заметную цитотоксическую активность. При этом соединение (**305**), содержащее OH-группу в положении 19, оказалось намного активнее карбонильного аналога (**306**).

Два новых оксииндоловых эпимерных дитерпена, антколорины G (**301**) и H (**302**), выделенные из культуральной жидкости мангрового эндофита *Aspergillus versicolor* [243], проявили существенные отличия в биологической активности: умеренную цитотоксичность проявил только эпимер (**302**).

Ряд выделенных алкалоидов можно рассматривать как производные малеимида и пирролидона (рис. 21). Три новых макроциклических алкалоида, названных аскомилактамами A–C (**308**–**310**) были выделены из мангрового эндофита *Didymella* sp. CYSK-4 [244], наряду с известными аналогами фомапирролидонами A и C (**311**, **312**) [245], чье строение было уточнено. Два новых стереоизомерных алкалоида, названные кладоспоритинами A (**313**) и B (**314**) были выделены из культуральной жидкости мангрового микромицета *Cladosporium* sp. HNWSW-1 [246], вместе с известным аналогом талароконволютином A (**315**) [247]. Интересно, что при одинаковой планарной структуре заметную цитотоксичность проявил только кладоспоритин B (**314**).

Некоторые выделенные алкалоиды можно отнести к производным пиридона (рис. 22). Донный микромицет *Arthrinium* sp. UJNMF0008 [248] продуцирует серию из восьми алкалоидов, содержащих необычные стуктурные мотивы: артпироны D–K (**316**–**323**), вместе с известным аналогом – апиоспорамидом (**324**) [249].

Системный скрининг морских микромицетов на широкий спектр антибактериальной активно-

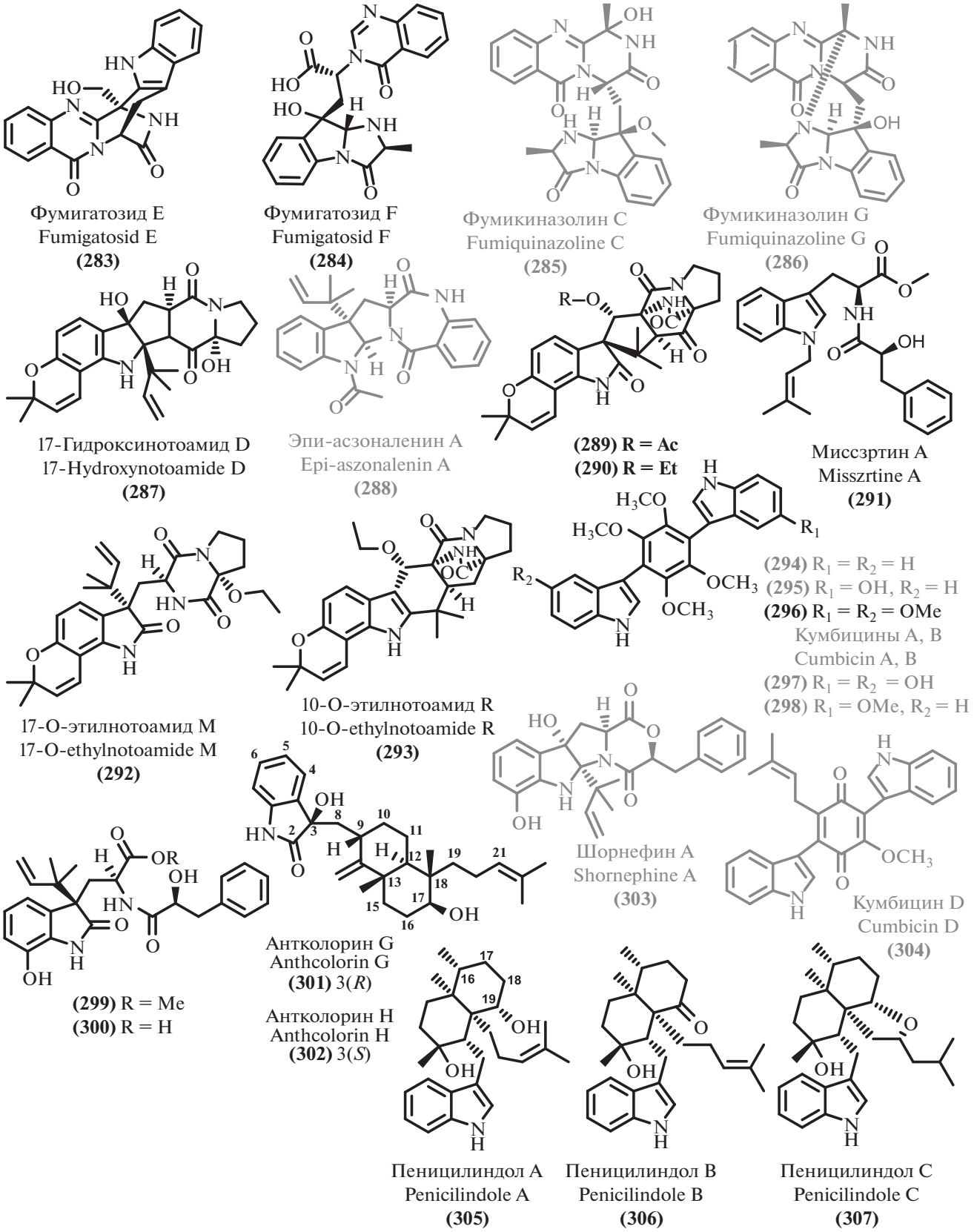


Рис. 20. Индолы и их производные.

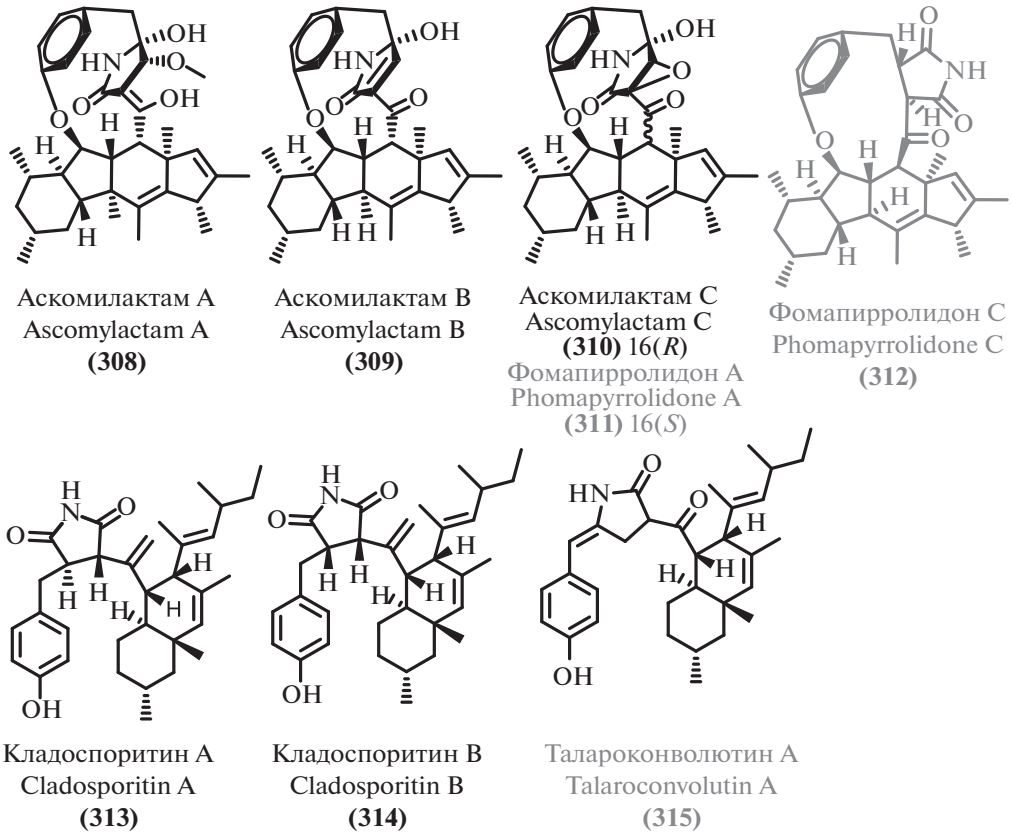


Рис. 21. Производные пирролидона и малеимида.

сти выявил штамм рода *Aspergillus* [75], продуцирующий новый алкалоид хэтоминин А (**326**), наряду с известным хэтоминином (**325**) [250].

Термофильный микромицет [126], выделенный из гидротермальных источников, оказался продуцентом ряда антибиотических соединений, наиболее активными из которых оказались известные алкалоиды лепорин А (**327**) (ранее был описан как инсектицид [251]) и хэтоминин (**325**) [250].

Из почвенного мангрового продуцента *Penicillium pinophilum* SCAU037 [130] выделен известный алкалоид пеницидон С (**330**) [252]. При изучении мангрового гриба рода *Cladosporium* [121], наряду с поликетидами, был выделен умеренно активный новый алкалоид 2-ацетоксиметил-3,5,6-триметилпиразин (**331**). Новый алкалоид акремолин С (**332**) с умеренной антибактериальной активностью, был выделен из антарктического почвенного гриба *Aspergillus sydowii* SP-1 [44]. Более позднее сообщение [253] предполагает, что это соединение может быть идентично ранее описанному акремолину В, в котором изопропильная группа находится в положении 2', а не 1'. Еще один пиразиновый алкалоид флавакол (**333**), был повторно выделен из мангрового *Aspergillus* sp. SCSIO41211 [254].

4. ТЕРПЕНОИДЫ, СТЕРОИДЫ И РОДСТВЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Значительную часть вторичных метаболитов экстремофильных микромицетов можно отнести к терпендоидам, стероидам или родственным соединениям. Были выделены сесквитерпены и сесквитерпеноиды (**334**–**393**) (рис. 24, 25); дитерпены и дитерпеноиды (**394**–**420**) (рис. 26); стероиды, стеролы и их производные (**421**–**457**) (рис. 27, 28).

Среди сесквитерпеноидов было выделено значительное число ранее неописанных соединений, многие из которых не проявили биологической активности. Например, три новых сесквитерпена песталотиопсина I-K (**334**–**336**), не проявивших активности, были выделены из *Pseudopestalotiopsis* sp. PSU-AMF45 [102]. Новый сесквитерпен (**337**), не проявившей антибиотической активности, был выделен из мангрового гриба рода *Pleosporales* [186].

Из морского эндофита *Aspergillus flocculosus* [255] выделены шесть новых сесквитерпенов (**338**–**342**), наряду с известными (**343**–**346**) [256], принадлежащими к семейству офиоболинов. Все выделенные соединения проявили сильную цитотоксическую активность.

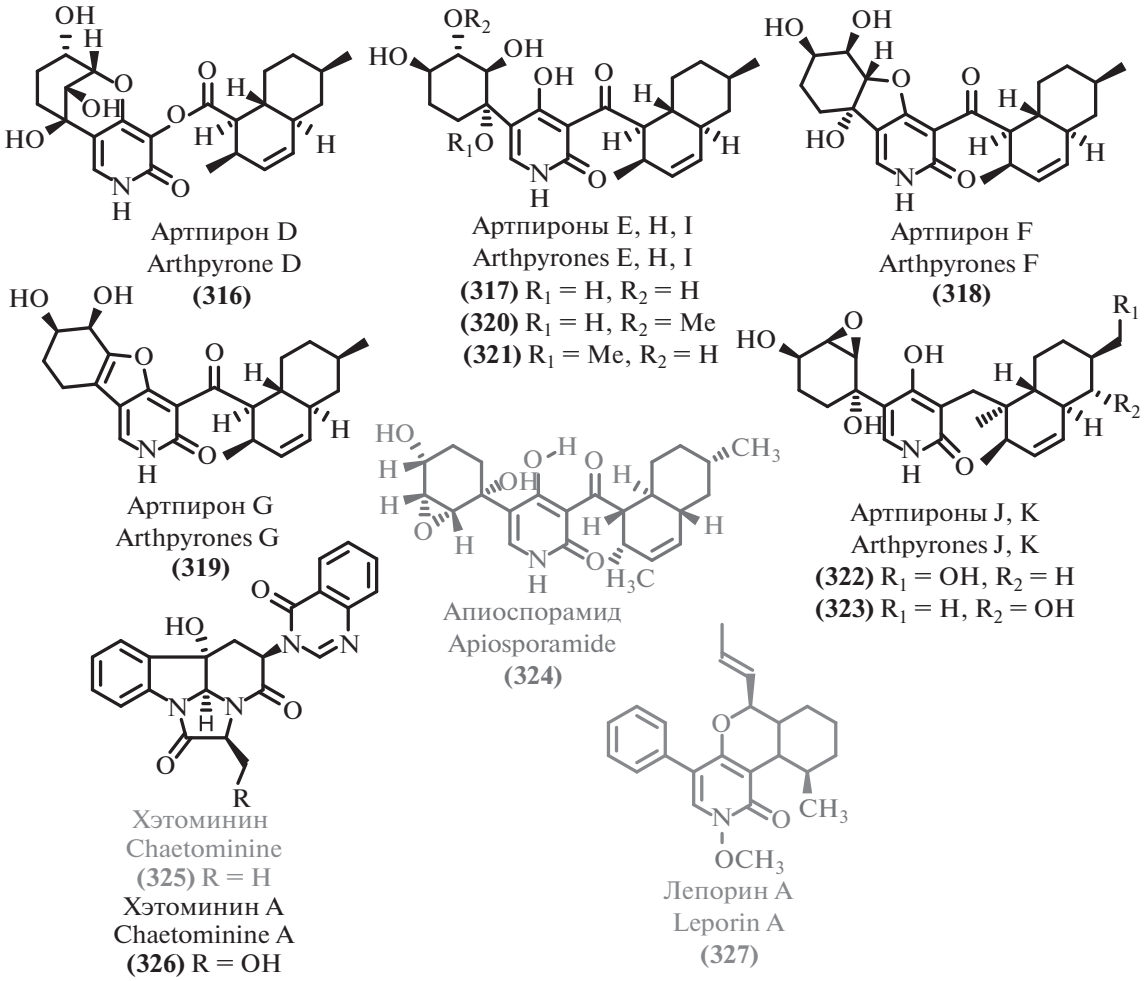


Рис. 22. Производные пиридона.

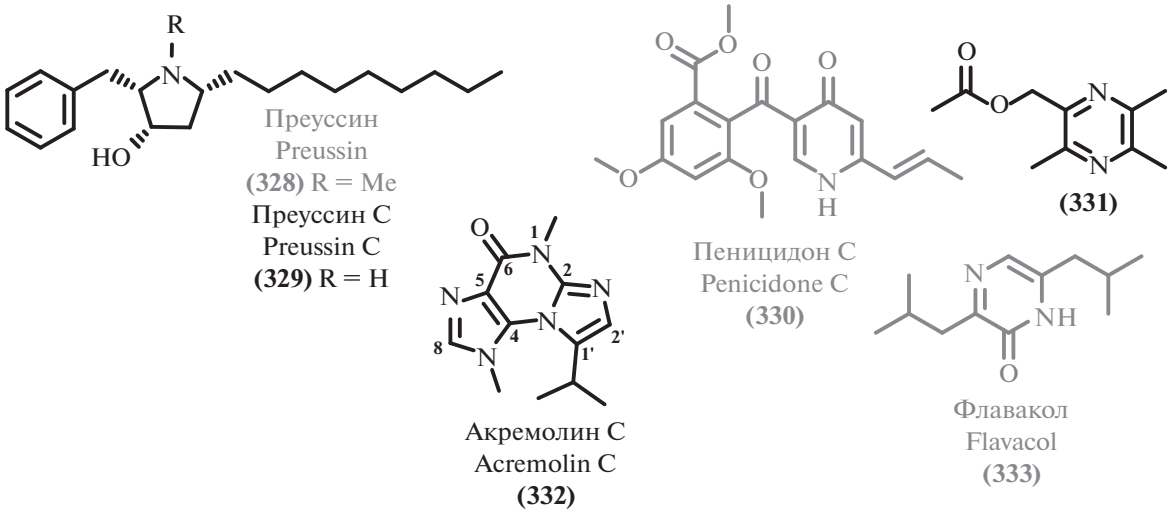


Рис. 23. Прочие алкалоиды.

Таблица 5. Данные о происхождении и биологической активности алкалоидов

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
259	*Penicillium* sp. ZZ380	Морской	AB CT	**MIC 5 μg/mL (**MRSA) **IC_{50} 11.32–29.1 μM (**U87-MG, U251, SHG-44, C6)	[229]
258	*Penicillium* sp. ZZ380 *Penicillium erubescens* KUFA0220	Морской Морской	AB CT	**MIC 8, 16, 32, 8, 32 μg/mL** (*E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 19434, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* B3/101 (VRE), *E. faecium* 1/6/63 (VRE)) [114] **MIC 48.35 μM** (*M. tuberculosis* $H_{37}Ra$) [230] **IC_{50} 14.71–29.55 μM (**KB, MCF-7, Vero) [230]	[229] [114]
260	*Penicillium* sp. ZZ380	Морской	CT AB	**IC_{50} 10.03–22.12 μM (**U87-MG, U251, SHG-44, C6) **MIC 4.0, 5.0 μg/mL (**MRSA, *E. coli*)	[78]
261				**IC_{50} 9.95–22.39 μM (**U87-MG, U251, SHG-44, C6) **MIC 12.0, 3.0 μg/mL (**MRSA, *E. coli*)	
262				**IC_{50} 15.76–26.64 μM (**U87-MG, U251, SHG-44, C6) **MIC 10.0, 11.0 μg/mL (**MRSA, *E. coli*)	
264				**IC_{50} 8.93 – 22.82 μM (**U87-MG, U251, SHG-44, C6) **MIC 2.0, 3.0 μg/mL (**MRSA, *E. coli*)	
266				**IC_{50} 1.06–8.52 μM (**U87-MG, U251, SHG-44, C6)	
267				**IC_{50} 12.89–23.92 μM (**U87-MG, U251, SHG-44, C6) **MIC 19.0, 4.0 μg/mL (**MRSA, *E. coli*)	
268				**IC_{50} 7.44–19.18 μM (**U87-MG, U251, SHG-44, C6) **MIC 4.0, 2.0 μg/mL (**MRSA, *E. coli*)	
292	Совместное культивирование *Aspergillus sulphureus* и *Isaria felina*	Морские	CT	**IC_{50} 10.0 μM (**22Rv1)	[240]
299	*Aspergillus alabamensis* EN-547	Морской	AB	**MIC 64.0, 32.0, 32.0, 64.0 μg/mL** **(***E. coli, Ed. ictaluri, M. luteus*, *V. alginolyticus*)	[234]
300				**MIC 16.0, 64.0, 64.0 μg/mL** **(***E. coli, Ed. ictaluri, M. luteus*)	
303				**MIC 32, 64, 32, 32 μg/mL** **(***E. coli, Ed. ictaluri, M. luteus*, *V. alginolyticus*)	
328	*Aspergillus candidus* KUFA 0062	Морской	CT AB AF	**IC_{50} 12.3–74.1 μM (**HepG2, HT29, HCT116, A549, A375, MCF7, U251, T98G) **MIC 32.0 μg/mL** **(***S. aureus* ATCC 29213*, E. faecalis* ATCC 29212) **MIC 32 μg/mL (**MRSA, VRE) **MBC 64.0 μg/mL (**VRE *E. faecalis* B3/101) **MIC 3.1–25 μg/mL (***Candida sp.*) [236] **MIC 1.6–12.5 μg/mL (***T. menta* SC2637*, T. rubrum* SC9199*, M. canis* SC9327*, A. fumigatus* SC 2100) [236]	[79]
329				**IC_{50} 57.2–215.7 μM (**HepG2, HT29, HCT116, A549, A375, MCF7, U251)	
296				**IC_{50} 73.2–212.5 μM (**HepG2, HT29, HCT116, A549, A375, MCF7, U251)	

Таблица 5. Продолжение

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
295				**IC_{50} 34.8–94.8 μM** (HepG2, HT29, HCT116, A549, A375, MCF7) **IC_{50} 33.2 μg/mL** (NS-1 ATCC TIB-18) [235]	
294				**IC_{50} 28 μg/mL** (NS-1 ATCC TIB-18) [235]	
297				**IC_{50} 43 μg/mL** (NS-1 ATCC TIB-18) [235]	
298				**IC_{50} 72.9–146.4 μM** (HepG2, HT29, HCT116, A549, A375) **IC_{50} 59 μg/mL** (NS-1 ATCC TIB-18) [235]	
304				**IC_{50} 26 μg/mL** (NS-1 ATCC TIB-18) [235]	
279	*Aspergillus* sp.	Морской	CT	**IC_{50} 4.86–69.4 μM** (PC-3, 22Rv1, LNCaP)	[231]
291	*Aspergillus* sp. SCSIO XWS03F03	Морской	CT	**IC_{50} 3.1 μM** (HL60) **IC_{50} 4.9 μM** (LNCaP)	[241]
331	*Cladosporium* sp. JS1-2	Мангровый	AB	**MIC 12.5 μg/mL** (*S. aureus*)	[121]
308	*Didymella* sp. CYSK-4	Мангровый	CT AT	**IC_{50} 4.4–6.8 μM** (MDA-MB-435, MDA-MB-231, SNB19, HCT116, NCI-H460, PC-3)	[244]
309				**IC_{50} 4.5–20.0 μM** (MDA-MB-435, MDA-MB-231, SNB19, HCT116, NCI-H460, PC-3)	
310				**IC_{50} 4.2–7.8 μM** (MDA-MB-435, MDA-MB-231, SNB19, HCT116, NCI-H460, PC-3) **IC_{50} 4.5–6.6 μM** (MDA-MB-231, HCT116)	
311				**IC_{50} 12–29 μM** (MDA-MB-435, MDA-MB-231, SNB19, HCT116, NCI-H460, PC-3) **IC_{50} 17.7 μM** (Vero) [245] **MIC 20.1–40.1 μg/mL** (MABA, LORA) [245]	
312				**IC_{50} 19.4 μM** (Vero) [245] **MIC 5.2–13.4 μg/mL** (MABA, LORA) [245]	
314	*Cladosporium* sp. HNWSW-1	Мангровый	CT	**IC_{50} 25.6–41.7 μM** (BEL-7042, K562, SGC-7901)	[246]
315				**IC_{50} 14.9–26.7 μM** (Hela, BEL-7042)	

Таблица 5. Продолжение

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
269	*Tolypocladium* sp.	Почва шахты, Ляньюань, Китай	АВ СТ	**MIC 6.25, 25, 25, 6.25, 25, 6.25, 25 μg/mL (***Alternaria fragariae, Corynespora cassiicola, Alternaria alternate, Botrytis cinereal Pers, C. personata, Verticillium dahliae Kleb, Sclerotinia sclerotiorum*) **MIC 25.0, 12.5 μg/mL (***B. cereus*, MRSA) **IC_{50} 16.32–37.8 μM** (Huh7, LN229, HCT116, MGC803, A549, MDA231)	[232]
270				**MIC 25, 25, 50 μg/mL** (*A. fragariae, B. cinereal Pers, C. personata*) **MIC 50 μg/mL (**MRSA) **IC_{50} 56.35–128.5 μM** (Huh7, LN229, HCT116, MGC803, A549, MDA231)	
271				**MIC 25, 12.5, 50 μg/mL** (*A. fragariae, C. cassiicola, C. personata*) **IC_{50} 192.8–196.8 μM** (Huh7, HCT116)	
272				**MIC 50, 25, 50 μg/mL (***A. fragariae, C. cassiicola, A. alternate*)*, B. cinereal Pers, C. personata, V. dahliae Kleb, S. sclerotiorum*) **MIC 100.0 μg/mL** (*B. cereus*) **IC_{50} 84.94–114.8 μM** (Huh7, LN229, HCT116, MGC803, A549, MDA231)	
273				**MIC 6.25, 12.5, 12.5 μg/mL** (*A. fragariae, C. cassiicola, C. personata*) **IC_{50} 198.6 μM** (A549)	
274				**MIC 25.0, 12.5 μg/mL** (*A. fragariae, C. cassiicola*) **IC_{50} 54.29–157.2 μM** (Huh7, LN229, HCT116, MGC803, A549, MDA231)	
275				**MIC 6.25, 50, 25, 100 μg/mL** (*A. fragariae, A. alternate, B. cinereal Pers, C. personata*) **IC_{50} 39.94–154.1 μM** (Huh7, LN229, HCT116, MGC803, A549, MDA231)	
276				**MIC 25.0 μg/mL** (*C. personata*),) **MIC 12,5 μg/mL** (*B. cereus*) **MIC 25.0 μg/mL** (MRSA, *M. lysodeikticus, Bact. paratyphosum, B. subtilis*, *E. aerogenes, S. typhi, P. vulgaris*) **IC_{50} 31.49–64.49 μM** (Huh7, LN229, HCT116, MGC803, A549, MDA231)	
277				**MIC 50 μg/mL** (*A. fragariae*) **MIC 100 μg/mL** (*B. cereus*) **IC_{50} 50.95–129.1 μM** (Huh7, LN229, HCT116, MGC803, A549, MDA231)	
278				**MIC 25 μg/mL** (*A. fragariae*) **IC_{50} 174.2 μM** (A549)	
332	*Aspergillus sydowii* SP-1	Антарктида	АВ	**MIC 4.0, 8.0, 32.0, 16.0 μg/mL (***S. epidermidis*, *S. aureus,* MRSA, MRSE)	[44]

Таблица 5. Окончание

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
327	*Aspergillus* sp. YQ-13	Осадок гидротермальных жерл, Куэйшаньтао, Тайвань / Термофил Морской	AB	**MIC 8.75, 5.42, 19.67, 1.33, 11.91 μg/mL** (*P. aeruginosa, E. coli, S. aureus, B. subtilis,* MRSA)	[126]
325	*Aspergillus fumigatus*			**MIC 21.13, 2.51, 3.72, 0.89, 6.25 μg/mL** (*P. aeruginosa, E. coli, S. aureus, B. subtilis,* MRSA) **IC_{50} 21.0–28.0 μM (**SW1116, K562) [250]	[75]
283	*Aspergillus fumigatus* SCSIO 41012	Глубоководный 3614 м	AB AF	**MIC 12.5, 6.25, 25.0, 6.25, 12.5 μg/mL** (*A. baumanii* ATCC 19606, *A. baumanii* ATCC 15122, *Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinu, S. aureus* ATCC 16339, *K. pneumonia* ATCC 14578)	[237]
284				**MIC 6.25 μg/mL** (*A. baumanii* ATCC 19606)	
286				**MIC 6.25, 12.5, 12.5, 12.5, 25.0 μg/mL** (*A. baumanii* ATCC 15122, *S. aureus* ATCC 16339, *Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinu, S. aureus* ATCC 29213, *K. pneumonia* ATCC 14578)	
285				**MIC 12.5, 1.5, 0.78, 25.0 μg/mL** (*Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinu, S. aureus* ATCC 16339, *S. aureus* ATCC 29213, *K. pneumonia* ATCC 14578)	
288				**MIC 50.0, 6.25, 12.5 μg/mL** (*A. baumanii* ATCC 19606, *A. baumanii* ATCC 15122, *Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinu*)	
318	*Arthrinium* sp. UJNMF0008	Глубоководный 3858 м	AB CT	**IC_{50} 11.4, 8.97 μM** (*M. smegmatis* ATCC607, *S. aureus* ATCC25923)	[248]
319				**IC_{50} 42.8 μM** (*S. aureus* ATCC25923)	
320				**IC_{50} 19.4, 8.37 μM** (*M. smegmatis* ATCC607, *S. aureus* ATCC25923)	
321				**IC_{50} 35.3, 14.1 μM** (*M. smegmatis* ATCC607, *S. aureus* ATCC25923)	
324				**IC_{50} 2.20, 1.66 μM** (*M. smegmatis* ATCC607, *S. aureus* ATCC25923) **IC_{50} 19.3, 11.7 μM** (U2OS, MG63) [249]	
330	*Penicillium pinophilum* SCAU037	Мангровый	CT	**IC_{50} 15.1–20 μg/mL** (KB, KBv200) **IC_{50} 44.3–80.8 μM** (SW1116, K562, KB, HeLa) [252]	[130]
333	*Aspergillus* sp. SCSIO41211	Мангровый	CT	**IC_{50} 0.15–22.9μM (**H1975, U937, K562, BGC823, MOLT-4, MCF-7, A549, HL60, Huh-7)	[254]
305	*Eupenicillium* sp. HJ002	Мангровый	CT	**IC_{50} 1.5–23.3 μM** (A549, HeLa, HepG-2)	[242]
306				**IC_{50} 18.6–47.2 μM** (A549, HeLa, HepG-2)	
302	*Aspergillus versicolor*	Мангровый	CT	**IC_{50} 43.7 μM** (HeLa)	[243]

Нитробензойные сесквитерпеноиды редко встречаются среди природных соединений. Из морского гриба *Aspergillus ochraceus* Jcma1F17 [257] были выделены три новых нитробензоил-сесквитерпеноидов, инсуликолиды B, C и 14-*O*-ацетилинсуликолид A (**351**, **352**, **349**), а также активные известные аналоги (**350**, **353**, **354**) [258, 259].

Три новых сесквитерпена эремофиланового типа были выделены из морского гриба *Cochliobolus lunatus* SCSIO41401 [76]. Выделенные соединения принадлежат к структурному семейству дендрифиеллинов и были названы дендрифиеллинами H–J (**355**, **347**, **348**). Два из них (**347**, **348**) проявили высокую цитотоксическую активность, в то время как (**355**) оказался неактивен, что говорит о критической важности боковой цепи дендрифиеллинов для реализации биологических свойств.

Был изучен спектр вторичных метаболитов мангрового эндофита *Cytospora* sp. [260]. Помимо выделения нового бициклического сесквитерпена сеирикардина D (**356**), не проявившего биологической активности, была установлена структура восьми известных метаболитов, антибактериальная активность была выявлена у (22*E*,24*R*)-5,8-эпидиокси-5α,8α-эргоста-6,9(11),22-триен-3β-ола (**357**) [261].

Два известных терпена с умеренной антибактериальной активностью – (7*S*)-(+)-гидроксисидоновая кислота (**358**) [262] и (7*S*, 11*S*)-(+)-12-гидроксисидоновая кислота (**359**) [263], – были выделены из антарктического почвенного гриба *Aspergillus sydowii* SP-1 [44].

Мангровый эндофит *Aspergillus* sp. xy02 [264] стал источником семи новых фенольных бисаболановых сесквитерпенов (**360**–**364**, **366**, **367**), проявивших слабую антибактериальную активность. Интересно, что эпимеры соединений (**361**) и (**362**) оказались полностью неактивными [264]. Также неактивным оказался терпен (**367**), содержащий *E*-двойную связь вместо *Z*-двойной связи в (**366**). Активность проявили некоторые ранее описанные аналоги: энгиодонтиумон I (**365**) [265], гидроксисидоновая кислота (**359**) [262, 263], (–)-(7*S*)-10-гидроксисидоновая кислота (**368**) [263, 264].

Четыре новых сесквитерпеноида, названные пениciедесмолами A–D (**369**–**372**) были выделены из мангрового эндофита рода *Penicillium*, однако только один из них продемонстрировал слабую цитотоксичность (**370**) [266].

Шесть сесквитерпеноидов, названных пултининами A–F (**373**–**378**) были выделены из морского гриба *Penicillium piltunense* KMM 4668 [151] наряду с известным структурным аналогом пенигрисацидом D (**385**) [267].

Помимо дитерпеновых алкалоидов, из культуральной жидкости мангрового эндофита *Aspergillus versicolor* [243] было выделено девять (**379**–**384**, **386**–**388**) новых сесквитерпенов, два из которых проявили слабую цитотоксическую активность (7-деокси-7,14-дидегидро-12-ацетокси-сидоновая кислота (**386**) и ее изомер 7-деокси-7,8-дидегидро-12-ацетокси-сидоновая кислота (**387**).

Из гриба морского происхождения *Cladosporium* sp. OUCMDZ-1635 [220] был выделен новый аналог абсцизовой кислоты – кладозацид (**393**).

Не менее распространены по сравнению с сесквитерпенами и их производными среди вторичных метаболитов микромицетов оказались дитерпены и дитерпеноиды (рис. 26).

В некоторых случаях дитерпеноиды выделяли наряду с сесквитерпеновыми метаболитами. Новый сесквитерпеноид 9,10-диолхиноевая кислота (**389**) и дитерпеноид руссоэллол C (**404**), наряду с известным данкастероном (**405**) [268, 269], были обнаружены среди вторичных метаболитов морского гриба *Talaromyces purpurogenus* [54]. Культивирование морского гриба *Trichoderma erinaceum* F1-1 [270] привело к выделению четырех новых (близких к известным) терпеноидов различной структуры (дитерпеноида (**420**) и сесквитерпеноидов (**390**–**392**), не проявивших биологической активности [303].

Три новых дитерпеноида долабелланового типа стахатраноны A–C (**394**–**396**) и три новых атранона Q–S (**397**–**399**) были выделены из морского гриба *Stachybotrys chartarum* [271]. Новые антраноны обладают существенной структурной новизной: атранон Q (**397**) является первым C_{23} атраноном, содержащим пропан-2-оновый мотив, присоединеный к долабеллановому ядру связью C–C; антранон R (**398**) является первым представителем C_{24} атранонов, содержащим в положении C-5–C-6 конденсированный 2-метилтетрагидрофуран-3-карбоксилатный цикл (рис. 26, упомянутые фрагменты выделены красным).

Фракционирование цитоксичных фракций экстракта культуральной жидкости морского штамма *Aspergillus porosus* [209] привело к выделению известного фитотоксина сфэропсидина A (**401**) [272] [273], с недавнего времени привлекающего интерес в качестве цитотоксического агента [274]. Интересно, что у второго выделенного аналога, очень близкого по строению известного аспергилоида E (**400**) [273], активность существенно ниже.

Выделенный из морского коралла гриб *Penicillium* sp. TJ403-1 [51] оказался продуцентом ряда цитотоксических спиродитерпеноидов семейства бревионов. Новый бревион O (**403**) не проявил ценных фармакологических свойств, в то время как известный бревион I (**402**) [275] оказался активен в отношении нескольких опухолевых клеточных линий.

Семь новых дитерпенов пимаранового типа – либертелленоны O–S (**410**–**414**) и эвтипелленоны A и B (**406**, **407**) – были выделены из культуральной жидкости почвенного Арктического гри-

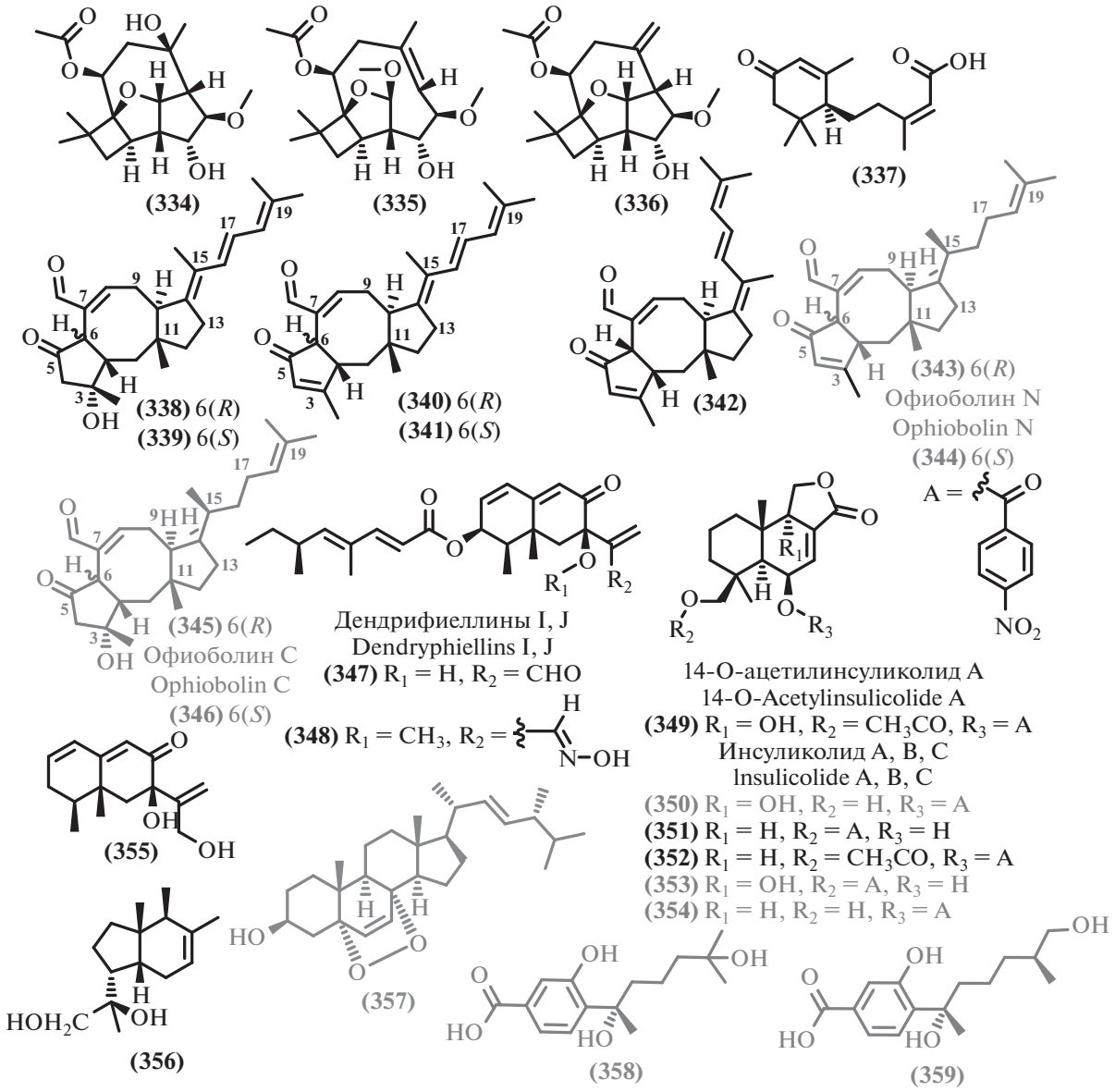


Рис. 24. Сесквитерпены и сесквитерпеноиды.

ба *Eutypella* sp. D-1 [276], наряду с известными либертелленонами H, J (**408**, **409**) [277]. Все выделенные соединения проявили цитотоксичность, а высокое разнообразие структур позволило установить некоторые взаимосвязи структура-активность. Например, метоксилирование в положении C-10 благоприятно для цитотоксического действия, в то время как обращение конфигурации C-13 и гидроксилирование в положении C-14 снижает активность.

Пять новых 20-нор-изопимарановых дитерпеноидов, включая набор из четырех диастереомеров, названных аспевентинами I–L (**415–418**) и метилированное производное аспевентин M (**419**), были выделены из морского гриба *Aspergillus wentii* SD-310 [278].

Еще одним структурным семейством выделенных вторичных метаболитов являются соединения, представляющие собой стероиды и родственные соединения. Новые стеролы являются редкостью среди вторичных метаболитов микроорганизмов, что делает интересным обнаружение нового стерола 3,7-дикето-цефалоспорина P_1 (**421**) в культуральной жидкости глубоководного *Aspergillus fumigatus* SCSIO 41012 [237]. Наряду с новым стеролом, были выделены два известных соединения этого класса: гельволовая кислота (**424**) [279, 280] и 22-ацетилизоциклоцитринол A (**435**) [281]. Интересно, что новый стерол (**421**) проявляет заметную специфическую активность против *Acinetobacter baumannii*. Гельволовая кислота (**424**) и 7 ее новых производных (**422**, **423**, **425**–**430**) были выделены

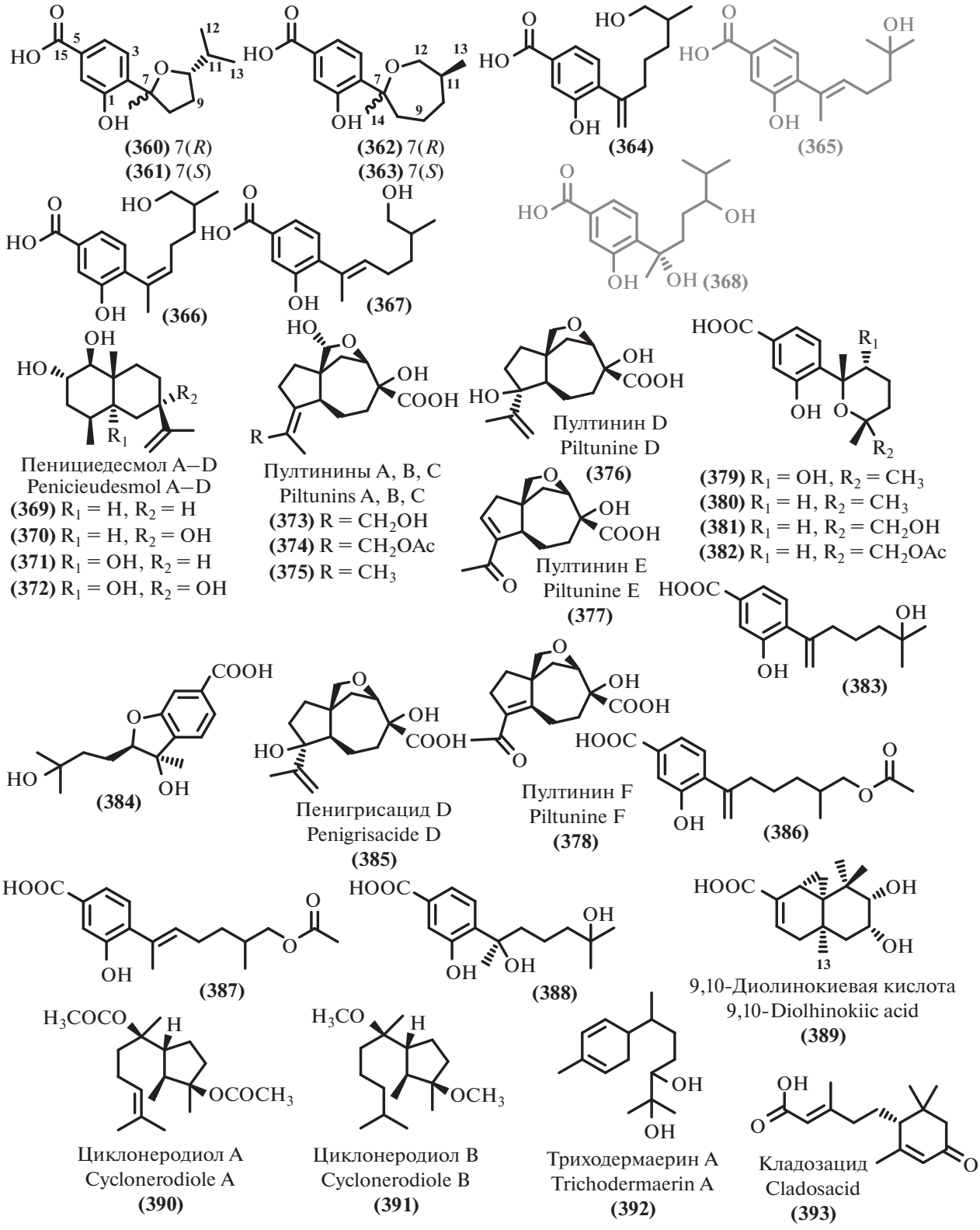


Рис. 25. Сесквитерпены и сесквитерпеноиды.

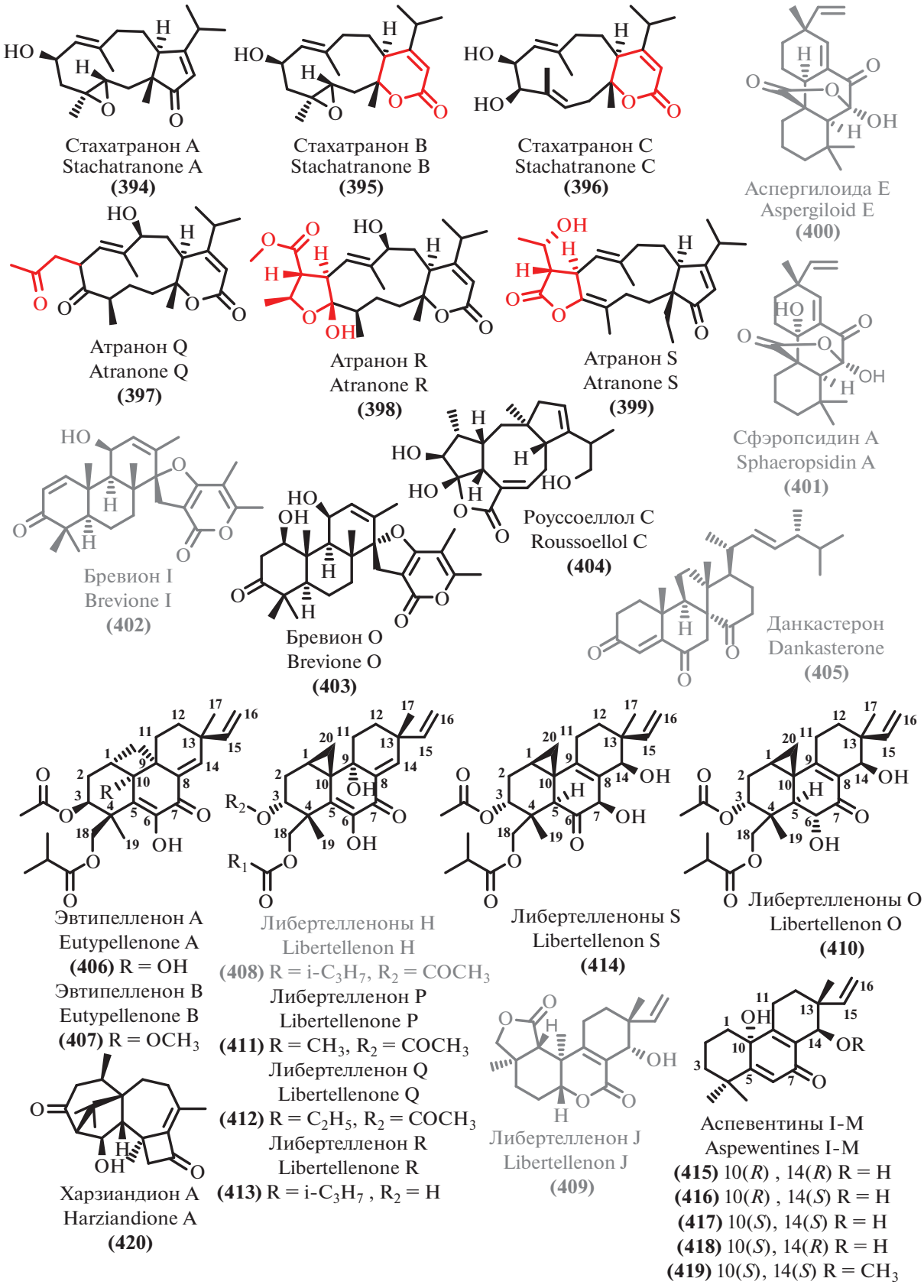


Рис. 26. Дитерпены и дитерпеноиды.

из морского *Aspergillus fumigatus* HNMF0047 [282]. Наибольшую антибиотическую активность из них проявили соединения (**422**–**424**).

Эндофит морских водорослей *Aspergillus alabamensis* EN-547 [234] стал источником нового стероида эргостанового типа, 28-ацетокси-12β,15α,25-тригидроксиэргоста-4,6,8(14),22-тетраен-3-она (**431**), проявившего слабую антимикробную активность.

20-Ацетокси-16α-метилпрег-17α,19-дигидрокси-(9,11)-эпокси-4-ен-3,18-дион (**433**) и ранее описанный токсичный терпеноид терретонин (**439**) [283], были получены из морского штамма *Penicillium citrinum* SCSIO 41017 [108].

Два новых терпеноида, аспертерпены N (**436**) и O (**437**) были выделены из эндофита морских водорослей *Aspergillus terreus* EN-539 [284] наряду с родственными известными соединениями терретонинами A [285] и G (**440**) [286], стереоконфигурация которых была уточнена. Терретонин G (**444**), как и ранее [286], продемонстрировал слабую антибактериальную активность [284]. Позже из термофильного *Aspergillus terreus* TM8 и морского *Aspergillus terreus* LGO13 [287] был выделен новый терпеноид терретонин O (**442**), предположительно являющийся биосинтетическим предшественником выделенных недавно терретонинов M (**441**) [288] и N (**443**) [289]. Эти соединения окислены по положению C-11, что нетипично для этого класса соединений, но их антибактериальная активность очень низка.

Из глубоководного гриба *Sarocladium kiliense* [290] был получен новый эргостан, сарокладион (**444**), первый стероид, содержащий уникальный 5,10:8,9-дисеко мотив. Помимо нового соединения, было выделено 20 известных соединений, некторые из которых проявляют антибиотические свойства. Высокая цитотоксическая активность была обнаружена у β-ситостенона (**438**) [291] и 4,6-дигидроксиевдесмана (**456**) [292]. Умеренную активность провявили 22*E*-7α-метокси-5α,6α-эпоксиэргоста-8(14),22-диен-3β-ол (**455**) [293], диосгенин (**457**) [294] и грамистерол (**432**) [291]. Из известных стеролов следует отметить также β-ситостерол (**454**) [295], выделенный из донного *Aspergillus sydowii* C1-S01-A7 [77]. Мангровый *Aspergillus* sp. SCSIO41211 [254] стал источником нового стероида (**434**), не проявившего активности.

Активные вторичные метаболиты глубоководного микромицета *Penicillium granulatum* MC CC 3A00 475 [47] включают несколько соединений стероидной природы: изонуатигенин I (**453**) [296]; пеницистероид A (**446**) [297]; аницеквол (**445**) [298].

Пять новых эргостанов, названных пеницистероидами D–H (**448**–**452**) были получены из глубоководного штамма *Penicillium granulatum* MCCC 3A00475 [299] наряду с 14 известными стероидами, некоторые из которых проявляют цитотоксическую активность (прежде всего пеницистероиды A,C (**446**, **447**) [297, 300].

5. СОЕДИНЕНИЯ СМЕШАННОГО И НЕУСТАНОВЛЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Помимо обобщенных в предыдущих главах соединений, были выделены антибиотические вторичные метаболиты, которые трудно однозначно отнести к одному из вышеупомянутых классов соединений. В ряде случаев очевидно, что для биосинтеза подобных соединений необходима совместная работа ферментной машинерии различных классов (поликетидсинтазы, нерибосомные пептидсинтазы, синтазы жирных кислот, ферменты биосинтеза стеролов, шикиматного пути и др.). В некоторых случаях (особенно для структурно простых соединений) недостаточно данных для подобного биогенетического отнесения.

Изучение природы антимикробной актиности экстракта культуры морского микромицета *Penicillium* ZZ1283 [301] привело к выделению и установлению стуктуры 18 метаболитов, один из которых оказался ранее неописанным соединением, названным пурпурид D (**458**), представляющий собой конъюгат сесквитерпена дриманового типа с аминокислотой *N*-ацетил-L-валином.

Два известных микотоксина – охратоксины A (**464**) и B (**465**) [302, 303], содержащие пептидный и поликетидный фрагменты, – были выделены из морского гриба *Aspergillus ochraceus* [42]. Этиловый эфир охратоксина A (**461**) и его антибиотическая активность были исследованы также при выделении из мангрового гриба *Aspergillus* sp. SCSIO41211 [254].

Упомянутый в Разделе 4 продуцент *Trichoderma erinaceum* F1-1 [270] морского просхождения при культивировании на среде с добавлением L-триптофана существенно изменил спектр синтезируемых вторичных метаболитов. Вместо терпеноидов, в этом случае было выделено 18 ароматических соединений, в том числе шесть новых соединений, названных триходеролидами A–F (**462**–**467**), из который только (**463**) проявил слабую цитотоксичность. Также были выделены известные ароматические соединения, проявившие цитотоксические свойства: 3,3'-диметокси-5,5'-диметилдифениловый эфир (**468**) [304], 3-*O*-метилдиорцинол (**469**) [305] и впервые выделенный из природного источника 4'-[(2-гидрокси-1,3-пропанил)бис[окси-4,1-фенилен(1-метилэтилиден)]]бисфенол (**470**) [306].

Химическое изучение экстракта морского гриба *Truncatella angustata* [307] привело к выделению неописанных ранее пренилированных циклогексанолов, у двух из которых (**471**, **472**) обнаружилась противовирусная активность.

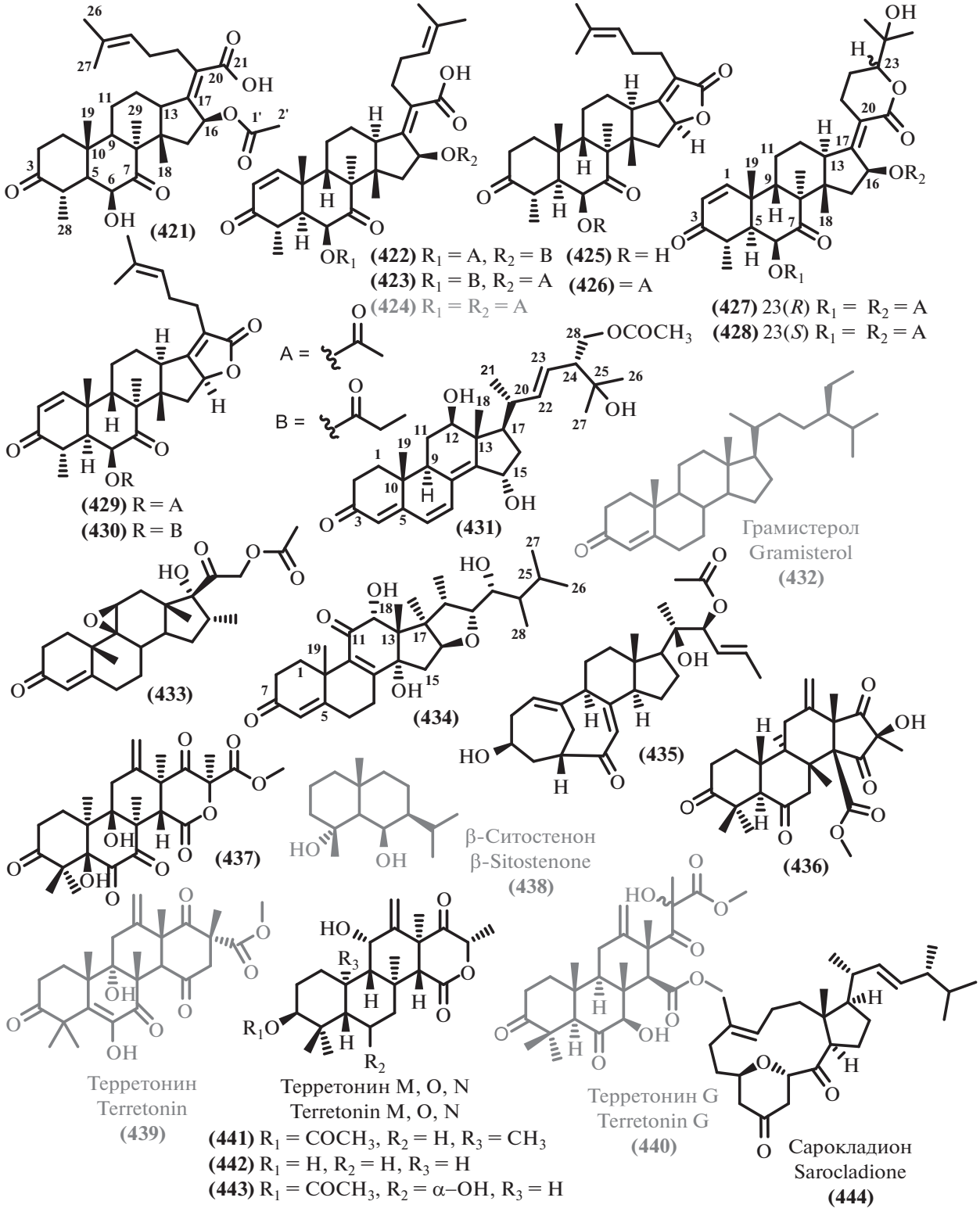


Рис. 27. Стероиды и их производные.

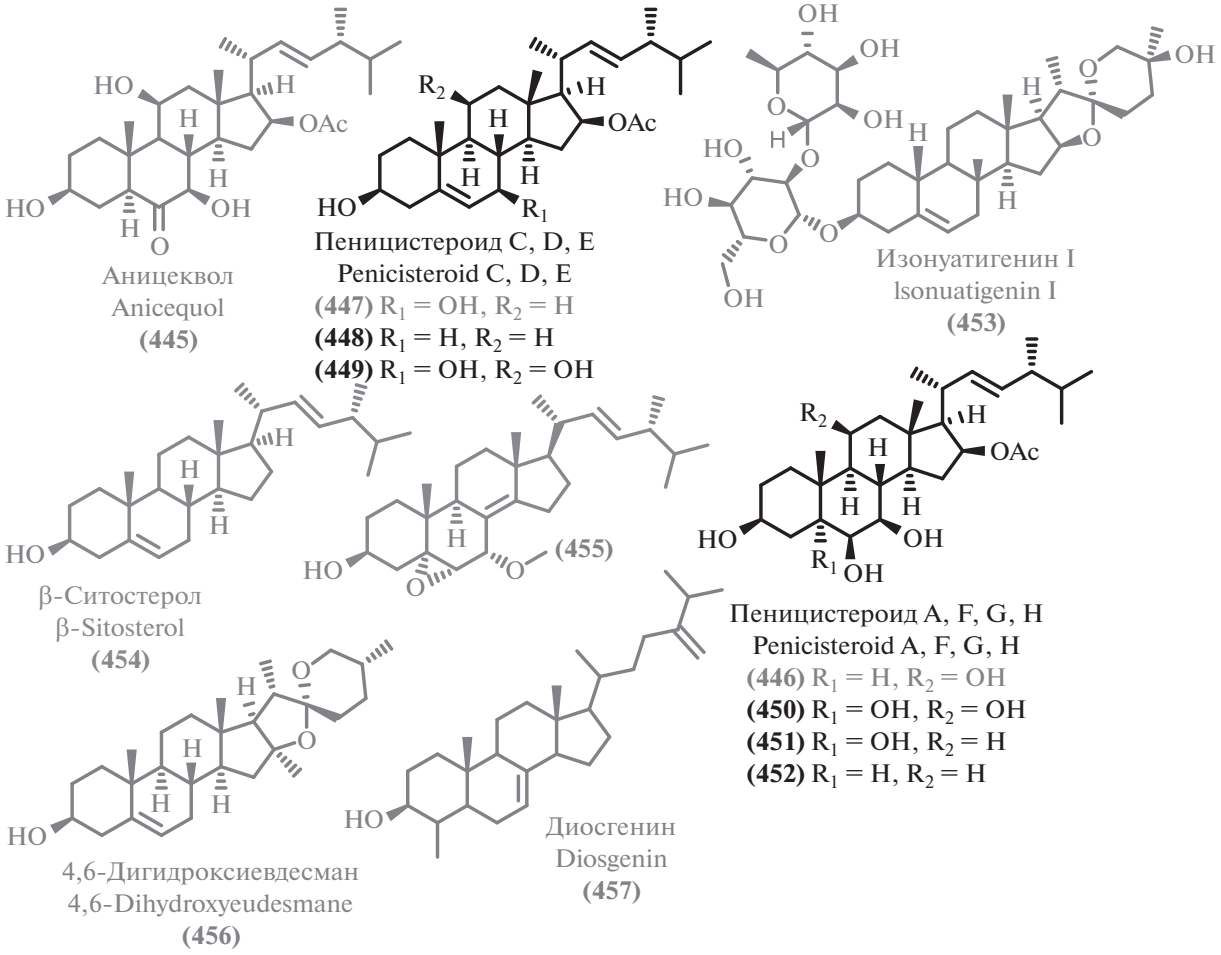


Рис. 28. Стеролы и их производные.

Из морского гриба *Penicillium* sp. LS54 [308] выделен пенициллилактон A (**473**), являющийся первым природным соединением, содержащим 7-членный лактонный цикл, конденсированный с фурановым кольцом.

Химическое изучение мангрового эндофита *Phyllosticta capitalensis* [141] выявило два известных соединения смешанного биосинтетического происхождения – меротерпеноиды гуигнардоны A (**474**) и J (**475**), проявившие антибиотическую активность [309].

Два новых фурандионовых производных с умеренной антифунгальной активностью, асперфурандионы A и B (**476**, **477**) были выделены из морского штамма *Aspergillus versicolor* [310].

Новое производное пентеновой кислоты 1,1'-диоксин-2,2'-дипропановая кислота (**478**) была получена из мангрового эндофита *Cladosporium* sp. JS1-2 [121] и проявила умеренную антибактериальную активность.

Talaromyces assiutensis JTY2 [311] мангрового происхождения стал источником трех новых метаболитов – производного циклопентенона талароциклопента A (**479**), простого эфира пирогаллола таларациклопента B (**480**) и нового производного итаконовой кислоты таларациклопента C (**481**), два из которых (**479**, **480**) проявили антибактериальную активность.

Три новых лактона, названные пенициллактонами A–C (**482–484**), были получены из мангрового *Penicillium* sp. TGM112 [312]. Интересно, что из всех изомеров только (**482**) проявил антибактериальные свойства.

Две новых пары эпимерных производных ацетаминофена пенициллквеи A–D (**485–488**), проявившие многообещающую активность против фитопатогенных грибов, были получены из культуры *Penicillium herquei* JX4 [313].

Еще одни новый полициклический цитотоксичный метаболит альтернатон A (**489**) был выделен из морского штамма, принадлежащего к роду *Alternaria* [88].

Мангровый эндофит *Cladosporium* sp. JJM22 [314] стал источником двух новых метаболитов (**495**, **496**)

Таблица 6. Данные о происхождении и биологической активности терпеноидов и родственных соединений

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
454	*Aspergillus sydowii* C1-S01-A7	Глубоководный 4950 м	CT	**IC_{50} 50 μg/mL** (HepG2)	[77]
421 **435**	*Aspergillus fumigatus* SCSIO 41012	Глубоководный 3614 м	AB AF	**MIC 50 μg/mL** (*A. baumanii* ATCC 19606) **MIC 12.5, 3.125 μg/mL** (*A. baumanii* ATCC 15122, *K. pneumonia* ATCC 14578) **MIC 1.5 μg/mL** (*F.oxysporum f. sp. Momordicae*) **MIC 100 μg/mL** (*S. epidermidis*) [281] **MIC 100 μg/mL** (*Enterococcus durans*) [281]	[237]
424	*Aspergillus fumigatus* SCSIO 41012 *Aspergillus fumigatus* HNMF0047	Глубоководный 3614 м Морской	AB	**MIC 25, 12.5 μg/mL** (*S. aureus* ATCC 16339, 29213) [237] **MIC 2, 4 μg/mL** (MRSA ATCC 33591, *B. subtilis* UBC 344) [279] **MIC 5.8 μg/mL** (*S. aureus*) [280] **MIC 4.6 μg/mL** (*P. aeruginosa*) [280] **MIC 16, 8 μg/mL** (*S. aureus, Streptococcus agalactie*)	[237] [282]
422 **423**	*Aspergillus fumigatus* HNMF0047	Морской	AB	**MIC 16 μg/mL** (*S. aureus, S. agalactie*) **MIC 8, 2 μg/mL** (*S. aureus, S. agalactie*)	[282]
395 **397**	*Stachybotrys chartarum*	Морской	AB AF	**MIC 16 μg/mL** (*A. baumanii*) **MIC 16 μg/mL** (*E. faecalis*) **MIC 32 μg/mL** (MRSA) **MIC 8 μg/mL** (*C. albicans*)	[271]
401 **400**	*Aspergillus porosus*	Морской	AB CT AF	**IC_{50} 32.6, 35.3 μM** (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC BAA-41) **IC_{50} 4.9 μM** (HCT-116 ATCC CCL-247) **MIC 10–100 μg/mL** (*Botrytis cinerea, Seiridium cardinal, Seiridium cupressi, Colletotrichum acutatum, F. oxysporum, F. solani, Fusicoccum amygdule, Penicillium expansum, Pyrenochaeta lvcopersici, Sclerotinia minor, S. wlerotiorum, Verticillium dahliae*) [272] **IC_{50} 6.74–10.68 μM** (KB, SGC-7901, SW1116, A549) [273] **IC_{50} 71.6, 77.8 μM** (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC BAA-41) **IC_{50} 32.7 μM** (HCT-116 ATCC CCL-247)	[209]
431	*Aspergillus alabamensis* EN-547	Морской	AB	**MIC 32, 64 μg/mL** (*Ed. ictaluri, V. alginolyticus*)	[234]

Таблица 6. Продолжение

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
338	*Aspergillus flocculosus*	Морской	CT	**IC_{50} 0.14–0.24 μM** (HCT-15, NUGC-3, NCI-H23, ACHN, PC-3, MDA-MB-231)	[255]
339				**IC_{50} 0.44–0.63 μM** (HCT-15, NUGC-3, NCI-H23, ACHN, PC-3, MDA-MB-231)	
340				**IC_{50} 0.88–1.40 μM** (HCT-15, NUGC-3, NCI-H23, ACHN, PC-3, MDA-MB-231)	
341				**IC_{50} 1.07–1.50 μM** (HCT-15, NUGC-3, NCI-H23, ACHN, PC-3, MDA-MB-231)	
342				**IC_{50} 1.53–2.01 μM** (HCT-15, NUGC-3, NCI-H23, ACHN, PC-3, MDA-MB-231)	
345				**IC_{50} 0.19–0.43 μM** (HCT-15, NUGC-3, NCI-H23, ACHN, PC-3, MDA-MB-231)	
346				**IC_{50} 0.16–0.36 μM** (HCT-15, NUGC-3, NCI-H23, ACHN, PC-3, MDA-MB-231) **IC_{50} 8 μM** (CLL) [256]	
343				**IC_{50} 0.20–0.30 μM** (HCT-15, NUGC-3, NCI-H23, ACHN, PC-3, MDA-MB-231)	
344				**IC_{50} 0.19–0.42 μM** (HCT-15, NUGC-3, NCI-H23, ACHN, PC-3, MDA-MB-231)	
389	*Talaromyces purpurogenus*	Морской	CT	**IC_{50} 12.6–35.7 μM** (HL-60, A549)	[54]
404				**IC_{50} 6.5–25.8 μM** (SW480, HL-60, A549, MCF-7)	
405				**IC_{50} 7.9–23.8 μM** (SW480, HL-60, A549, MCF-7) **ED_{50} 2.2 μg/mL** (P-388) 10.1039/a903840j **GI_{50} 1.8–15.8 μM** (38 Human cancer cell lines) [269]	
402	*Penicillium* sp. TJ403-1	Морской	CT	**IC_{50} 4.92–8.6 μM** (HL-60, A549, HEP3B) **IC_{50} 7.44–32.5 μM** (MCF-7, A549) [275]	[51]
351	*Aspergillus ochraceus* Jcma1F17	Морской	CT AV	**IC_{50} 23–30 μM** (ACHN, OS-RS-2, 786-O)	[257]
349				**IC_{50} 2.3–5.3 μM** (ACHN, OS-RS-2, 786-O)	
352				**IC_{50} 11–14 μM** (ACHN, OS-RS-2, 786-O)	
350				**IC_{50} 0.89–1.5 μM** (ACHN, OS-RS-2, 786-O) **IC_{50} 2.11–6.35 μM** (H1975, U937, K562, BGC823, Molt-4, MCF-7, A549, HeLa, HL60, Huh-7) [258]	
353				**IC_{50} 4.3–11 μM** (ACHN, OS-RS-2, 786-O) **IC_{50} 1.95–17 μM** (H1975, U937, K562, BGC823, Molt-4, MCF-7, A549, HeLa, HL60, Huh-7) **IC_{50} 17, 9.4 μM** (H3N2, EV71) [258]	
354				**IC_{50} 20–30 μM** (ACHN, OS-RS-2, 786-O)	
347	*Cochliobolus lunatus* SCSIO 41401	Морской	CT AB	**IC_{50} 1.41–4.3 μM** (ACHN, 786-O, OS-RC-2, HepG-2, SGC7901)	[76]
348				**IC_{50} 3.1–27 μM** (ACHN, 786-O, HepG-2, SGC7901) **MIC 1.5–13 μg/mL** (*S. aureus*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*)	

Таблица 6. Продолжение

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
433 **439**	*Penicillium citrinum* SCSIO 41017	Морской	CT AF	**IC_{50} 13.5–18 μM** (SF-268, MCF-7, HepG-2, A549) **MIC 125–250 μg/mL** (*C. asianum, C. acutatum*)	[108]
440	*Aspergillus terreus* EN-539	Морской	AB	**MIC 32, 8 μg/mL** (*M. luteus, S. aureus*)	[284]
442 **443**	*Aspergillus terreus* TM8 *Aspergillus terreus* LGO13	Почва Египта (оптимум роста 45–50°C)/ Термофил Морской	AB AF	**MIC 250 μg/mL** (*S. aureus* ATCC 6538-P, *P. aeruginosa* ATCC 27853) **MIC 250 μg/mL** (*S. aureus* ATCC 6538-P, *B. cereus* ATCC 11778, *C. albicans* ATCC 10231) **Качественная АВ активность** (*E. coli* DSMZ 1058, *B. subtilis* DSMZ 704, *P. agarici* DSMZ 11810, *M. luteus* DSMZ 1605, *S. warneri* DSMZ 20036) [289]	[287]
386 **387**	*Aspergillus versicolor*	Мангровый	CT	**IC_{50} 83.8 μM** (HeLa) **IC_{50} 53.5 μM** (HeLa)	[243]
357	*Cytospora* sp.	Мангровый	AB	**MIC 233.3, 58.3, 58.3 μg/mL** (MRSA, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*)	[260]
361 **362** **364** **365** **368**	*Aspergillus* sp. xy02	Мангровый	AB	**IC_{50} 32.2 μM** (*S. aureus* ATCC 25923) **IC_{50} 36 μM** (*S. aureus* ATCC 25923) **IC_{50} 41.9 μM** (*S. aureus* ATCC 25923) **IC_{50} 33.4 μM** (*S. aureus* ATCC 25923) **MIC 256 μg/mL** (*B. subtilis*) [265] **IC_{50} 36.3 μM** (*S. aureus* ATCC 25923) **MIC 8, 32 μg/mL** (*V. harveyi, V. parahemolyticus*) [263] **MIC 32 μg/mL** (*S. aureus, A. hydrophilia*) [263]	[264]
370	*Penicillium* sp. J-54	Мангровый	CT	**IC_{50} 90.1 μM** (K-562)	[266]
410 **411** **412** **413** **414** **406** **407** **408** **409**	*Eutypella* sp. D-1	Арктика	CT	**IC_{50} 2.2–6 μM** (HeLa, MCF-7, HCT-116, PANC-1, SW1990) **IC_{50} 1–3.6 μM** (HeLa, MCF-7, HCT-116, PANC-1, SW1990) **IC_{50} 0.8–2.1 μM** (HeLa, MCF-7, HCT-116, PANC-1, SW1990) **IC_{50} 26.6 μM** (PANC-1) **IC_{50} 29.4** (HCT-116) **IC_{50} 10.3–13.1 μM** (HeLa, MCF-7, HCT-116, PANC-1, SW1990) **IC_{50} 6–8.4 μM** (HeLa, MCF-7, HCT-116, PANC-1, SW1990) **IC_{50} 0.3–1.8 μM** (HeLa, MCF-7, HCT-116, PANC-1, SW1990) **IC_{50} 3.31–44.1 μM** (U251, SW-1990, SG7901, MCF-7, Huh-7, HeLa, H460) [277]	[276]

Таблица 6. Продолжение

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
358	*Aspergillus sydowii* SP-1	Антарктида Мангровый	AB AF	**MIC 0.5, 1, 0.25, 0.5 μg/mL** (*S. aureus,* MRSA, *S. epidermidis,* MRSE)	[44] [264]
359	*Aspergillus* sp. xy02			**MIC 0.5, 1, 0.25, 0.5 μg/mL** (*S. aureus,* MRSA, *S. epidermidis,* MRSE) [44] **IC_{50} 34 μM** (*S. aureus* ATCC 25923) [264] **MIC 0.5 μg/mL** (*S. aureus, V. parahemolyticus*) [263] **MIC 32 μg/mL** (*Gaeumannomyces graminis*) [263]	
446	*Penicillium granulatum* MCCC 3A00475	Глубоководный 2284 м	CT AF	**IC_{50} 8.2 μM** (HepG2) [47] **IC_{50} 4.1–12.5 μM** (A549, SHG-44, HepG2, BIU-87, ECA-109, Hela-S3, PANC-1, BEL-7402) [299] **IC_{50} 15–40 μg/mL** (HeLa, SW1990, NCI-H460) [297] **Качественная AF активность** (*Aspergillus niger*) [297]	[47] [299]
453	*Penicillium granulatum* MCCC 3A00475	Глубоководный 2284 м	CT	**IC_{50} 8.6 μM** (HepG2)	[47]
445				**IC_{50} 1.2 μM** (DLD-1 cells on polyHEMA-coated) [298] **IC_{50} 40 μM** (DLD-1 cells on uncoated plates) [298]	
449	*Penicillium granulatum* MCCC 3A00475	Глубоководный 2284 м	CT	**IC_{50} 5.5–8.3 μM** (A549, SHG-44)	[299]
451				**IC_{50} 4.8–14.4 μM** (A549, SHG-44, HepG2, BIU-87, ECA-109, Hela-S3, PANC-1, BEL-7402)	
452				**IC_{50} 4.4–9.2 μM** (A549, HepG2, BIU-87, ECA-109, Hela-S3)	
447				**IC_{50} 4.4–9.9 μM** (A549, SHG-44, ECA-109, Hela-S3, PANC-1) **Качественная AF активность** (*C. albicans* ATCC 10231*, S. cerevisiae* ATCC 9080) [300] **Качественная AB активность** (*S. aureus* ATCC 6538-P, *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633) [300]	
385	*Penicillium griseofulvum*	Глубоководный 1420 м	CT	**IC_{50} 28.7 μM** (ECA-109)	[267]
415	*Aspergillus wentii* SD-310	Глубоководный 2038 м	AB AF	**MIC 8, 32, 8, 8 μg/mL** (*E. tarda, P. aeruginosa, V. harveyi, V. parahaemolyticus*)	[278]
416				**MIC 32, 8, 8, 8 μg/mL** (*E. coli, E. tarda, V. harveyi, V. parahaemolyticus*)	
417				**MIC 32 μg/mL** (*Aeromonas hydrophilia, V. anguillarum*)	
418				**MIC 32, 32 μg/mL** (*E. tarda, V. harveyi*)	
419				**MIC 32, 32 μg/mL** (*V. anguillarum, V. harveyi*) **MIC 4 μg/mL** (*F. graminearum*)	
432	*Sarocladium kiliense*	Глубоководный 5070 м	CT	**IC_{50} 25.8 μM** (HeLa-S3)	[290]
438				**IC_{50} 9.2 μM** (HeLa-S3)	
457				**IC_{50} 44.2 μM** (HeLa-S3)	
456				**IC_{50} 9.3 μM** (HeLa-S3)	
455				**IC_{50} 30.1 μM** (HeLa-S3) **IC_{50} 70 μM** (A549) [293]	

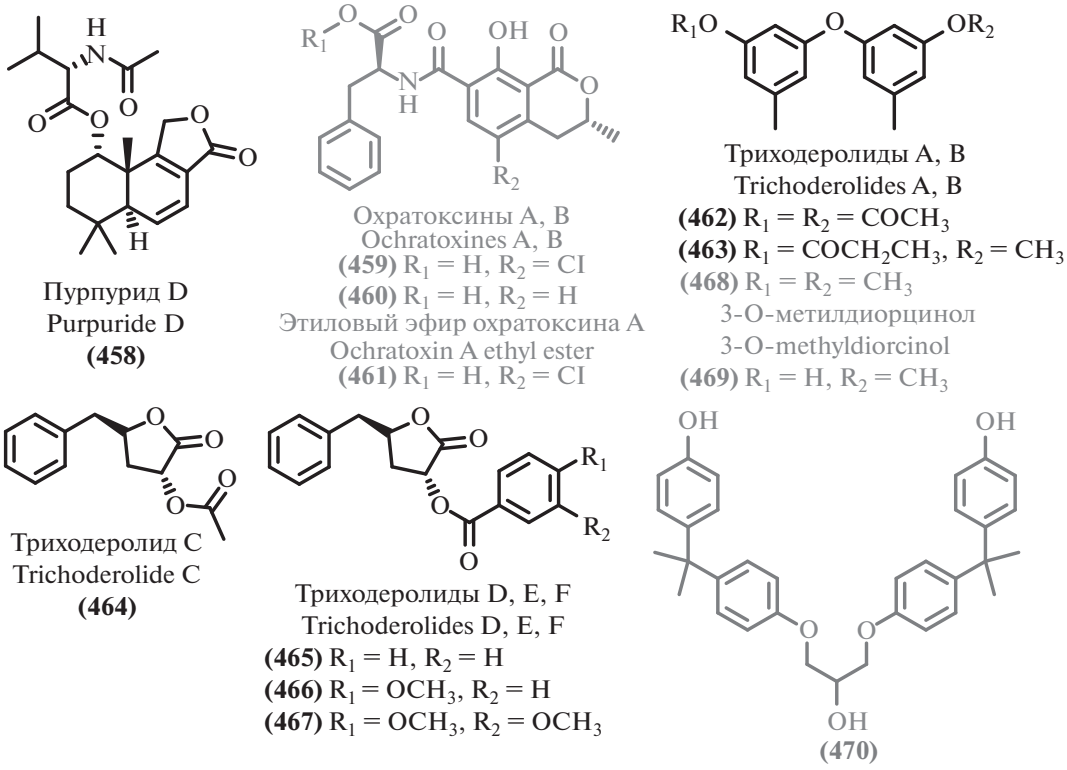


Рис. 29. Пурпурид, охратоксины, триходеролиды.

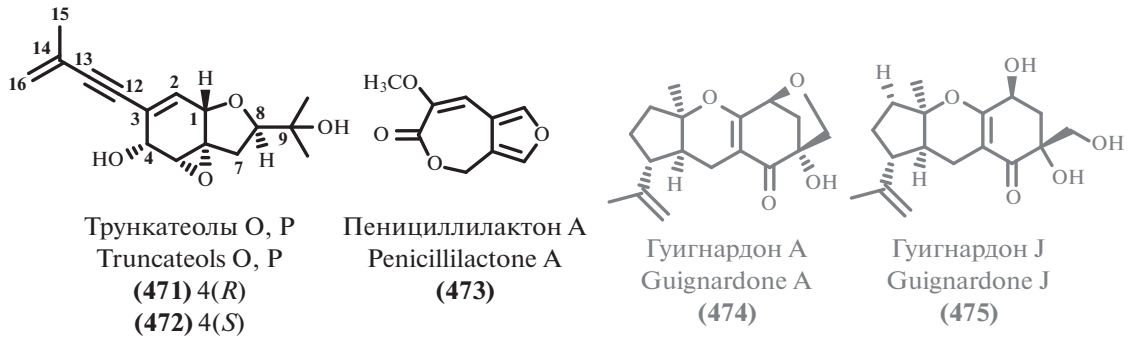


Рис. 30. Трункатеолы, пенициллактон A, гуигнардоны.

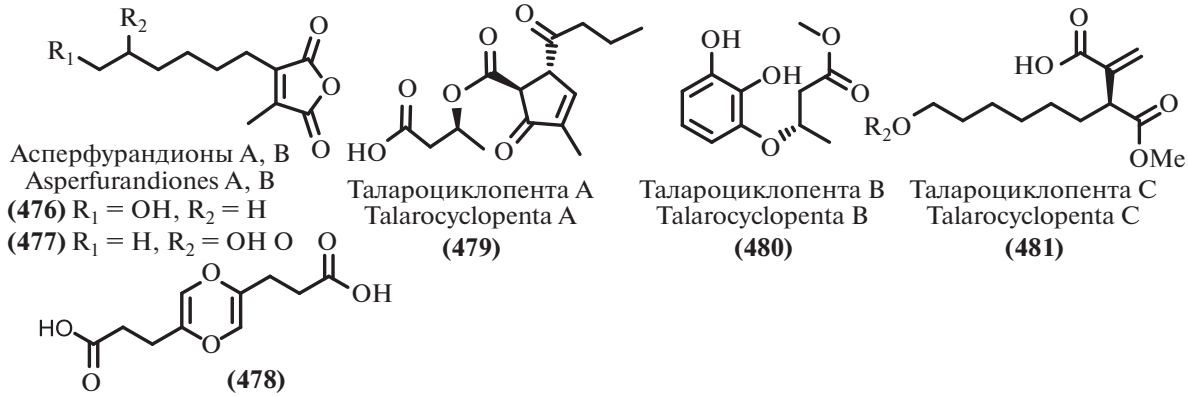


Рис. 31. Асперфурандионы, талароциклопента.

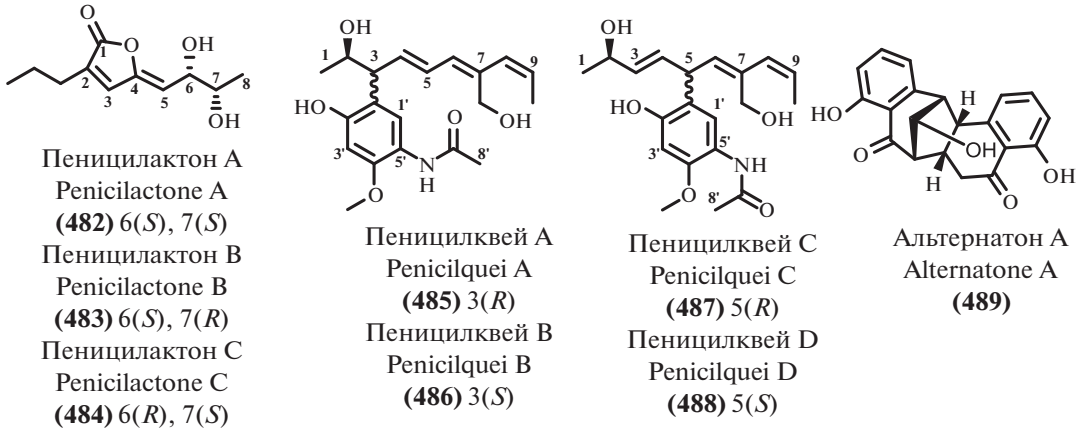


Рис. 32. Пенициллактоны, пенициллквеи, альтернатон А.

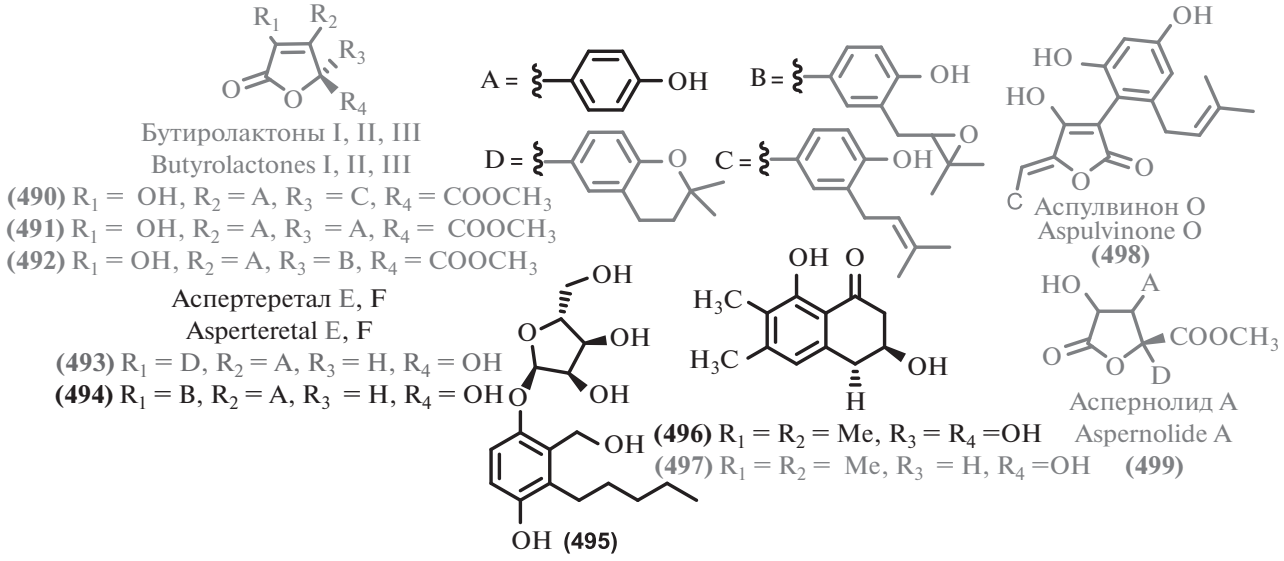


Рис. 33. Бутиролактоны и фенолы.

и нескольких известных, только один из которых (**497**) [315] проявил антибактериальную активность.

Морской штамм *Aspergillus terreus* LGO13 [287], помимо описанных выше терпеноидов, продуцирует ряд известных метаболитов, проявивших антибиотическую активность: бутиролактоны I–III (**490–492**) [316] и аспулвинон O (**498**) [317]. Глубоководный микромицет, принадлежащий к тому же виду, *Aspergillus terreus* SCSIO FZQ028 [318], стал источником ряда структурно близких бутенолидов, в том числе нового соединения (±)-аспертеретала F (**494**) и его недавно описанного близкого аналога аспертеретала E (**493**) [319], содержащего 2-бензил-3-фенил-замещенный лактон. Было выделено еще 5 известных метаболитов, в том числе упомянутый выше бутиролактон III (**492**). Антибактриальная активность проявилась у асперетала E (**493**) и аспернолида A (**499**) [320].

Культивирование морского гриба *Aspergillus versicolor* MCCC 3A00080 [321] с добавлением ингибитора гистондеацетилаз вориностата (*N*-гидрокси-*N*'-фенилоктандиамид) индуцировало биосинтез нового вторичного метаболита версиперола A (**513**), проявившего небольшую антибактериальную активность.

Три новых производных итаконовой кислоты, выделенные из морского *Aspergillus niger*, были названы асперитаконовыми кислотами A–C (**500–502**) [322]. Описанные осединения не проявили заметной цитотоксичности, но продемонстрировали умеренную антибактериальную активность.

Новый вторичный метаболит 1-(2',6'-диметилфенил)-2-*н*-пропил-1,2-дигидропиридазин-3,6-

Таблица 7. Данные о происхождении и биологической активности соединений смешанного и неустановленного происхождения

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
458	*Penicillium* sp. ZZ1283	Морской	AB AF	**MIC 4, 3 μg/mL** (*S. aureus*, *E. coli*) **MIC 8 μg/mL** (*C. albicans*)	[301]
459 **460**	*Aspergillus ochraceus*	Морской	CT	**IC_{50} 0.8–1.0 μg/mL** (BME-UV1, MDCK) [328] **IC_{50} 17–87 μM** (IHKE) [329] **IC_{50} 0.3 μM** (Hep G2) [330] **IC_{50} 3 μM** (A2780)	[42]
461	*Aspergillus* sp. SCSIO41211	Мангровый	CT	**IC_{50} 0.031–23.2 μM** **(**H1975, U937, K562, BGC823, MOLT-4, MCF-7, A549, Hela, HL60, Huh-7)	[254]
463 **468** **469** **470**	*Trichoderma erinaceum* F1-1	Морской	CT	**IC_{50} 31.9 μM** (MDA-MB-435) **IC_{50} 12.5 μM** (MDA-MB-435) **IC_{50} 41.4 μM** (MDA-MB-435) **IC_{50} 22.3, 18.4 μM** (MDA-MB-435, A549)	[270]
471 **472**	*Truncatella angustata*	Морской	AV	**IC_{50} 39 μM** (HIV-1) **IC_{50} 16.1 μM** (HIV-1)	[307]
473	*Penicillium* sp. LS54.	Морской	AB	**MIC 8 μg/mL** (*V. harveyi*)	[308]
476 **477**	*Aspergillus versicolor* DJ013	Морской	AF	**MIC 64 μg/mL** (*G. graminis, C. neoformans, C. albicans*) **MIC 64 μg/mL** (*G. graminis, C. neoformans, C. albicans*)	[310]
478	*Cladosporium* sp. JS1-2	Мангровый	AB	**MIC 25, 25, 12.5 μg/mL** *S. aureus, E. coli, B. cereus*)	[121]
479 **480**	*Talaromyces assiutensis* JTY2	Мангровый	AB	**MIC 20, 40 μg/mL** (*S. aureus, E. coli*) **MIC 5, 2.5, 5, 2.5, 2.5, 1.25 μg/mL** (*M. tetragenus, S. aureus, S. albus, B. cereus, B. subtilis, E. coli*)	[311]
482	*Penicillium* sp. TGM112	Мангровый	AB	**MIC 6.25 μg/mL** (*S. aureus*)	[312]

Таблица 7. Продолжение

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
485	*Penicillium herquei* JX4	Мангровый	AF	**MIC 25, 50, 25, 100, 200, 50, 50, 50 μg/mL** (*Alternaria brassicicola*, *P. parasitica var. nicotianae*, *Colletotrichum capsici, B. oryzae*, *Diaporthe medusaea Nitschke*, *Ceratocystis paradoxa Mareau*, *P. theae, Alternaria citri*)	[313]
486				**MIC 25, 50, 25, 100, 100, 50, 25, 50 μg/mL** (*Alternaria brassicicola*, *P. parasitica var. nicotianae*, *Colletotrichum capsici, B. oryzae*, *Diaporthe medusaea Nitschke*, *Ceratocystis paradoxa Mareau*, *P. theae, Alternaria citri*)	
487				**MIC 50, 100, 25, 200, 200, 100, 50, 25 μg/mL** (*Alternaria brassicicola*, *P. parasitica var. nicotianae*, *Colletotrichum capsici, B. oryzae*, *Diaporthe medusaea Nitschke*, *Ceratocystis paradoxa Mareau*, *P. theae, Alternaria citri*)	
488				**MIC 50, 100, 50, 200, 200, 100, 50, 25 μg/mL** (*Alternaria brassicicola*, *P. parasitica var. nicotianae*, *Colletotrichum capsici, B. oryzae*, *Diaporthe medusaea Nitschke*, *Ceratocystis paradoxa Mareau*, *P. theae, Alternaria citri*)	
497	*Cladosporium* sp. JJM22	Мангровый	AB	**IC_{50} 20 μM** (*S. aureus, B. cereus,* MRSA, *E. coli, V. alginolyticus, V. parahemolyticus*) **MIC 200 μg/mL** (*S. aureus,* MRSA, *M. gypseum* SH-MU-4) [315]	[314]
490	*Aspergillus terreus* LGO13	Морской	AB AF CT	**MIC 125, 250 μg/mL** (*S. aureus* ATCC 6538-P, *B. cereus* ATCC 11778) **MIC 250 μg/mL** (*C. albicans* ATCC 10231) **0.576–1 mM** (MCF-7/AGR, U251, SW620, H522, M14, SKOV3, DU145, A498) [316]	[287]
491				**Качественная AF активность** (*C. albicans* ATCC 10231) **0.626–1 mM** (MCF-7/AGR, U251, SW620, H522, M14, SKOV3, DU145, A498) [316]	
492				**MIC 250.0 μg/mL** (*B. cereus* ATCC 11778) **0.16–1 mM** (MCF-7/AGR, U251, SW620, H522, M14, SKOV3, DU145, A498) [316]	
498				**MIC 62.5, 250, 250 μg/mL** (*S. aureus* ATCC 6538-P, *S. cerevisiae* ATCC 9080, *B. cereus* ATCC 11778) **MIC 250 μg/mL** (*C. albicans* ATCC 10231)	
493	*Aspergillus terreus* SCSIO FZQ028	Глубоководный 1718 м	AB	**Качественная AB активность** (*S. aureus, B. thuringiensis, B. subtilis, E. coli*)	[318]
499				**Качественная AB активность** (*S. aureus, B. thuringiensis, B. subtilis, E. coli*)	
500	*Aspergillus niger*	Морской	AB	**MIC 16 μg/mL** (*S. aureus*)	[322]
501				**MIC 32 μg/mL** (*S. aureus*)	
502				**MIC 32 μg/mL** (*S. aureus*)	

Таблица 7. Окончание

В.	Продуцент/вид	Происхождение/тип экстремофильности	Активность/ токсичность	EC_{50}, IC_{50}, MIC	С.
513	*Aspergillus versicolor* MCCC 3A00080	Глубоководный 2721 м	AB	**MIC 8 μg/mL** (*S. aureus*)	[321]
474 **475**	*Phyllosticta capitalensis*	Мангровый	AB	**MIC 25.5 μg/mL** (*P. aeruginosa*) [309] **MIC 50, 50 μg/mL** (MRSA, *P. aeruginosa*) **MIC 89.3 μg/mL** (*B. subtilis*) [309]	[141]
507 **508** **509** **510**	*Eutypella* sp. D-1	Арктика	CT	**IC_{50} 7.3–17.1 μM** (DU145, SW1990, Huh7, PANC-1) **IC_{50} 4.9–11.0 μM** (DU145, SW1990, Huh7, PANC-1) **IC_{50} 9.6–13.5 μM** (DU145, SW1990, Huh7, PANC-1) **IC_{50} 7.5–13.4 μM** (DU145, SW1990, Huh7, PANC-1)	[325]
511	*Penicillium* sp. RO-11	Отложения горячего источника (45–65°C), Саудовская Аравия/Термофил	AB CT	**MIC 1.4, 2.5, 0.13 μg/mL** (*S. aureus*, *Escherichia fergusonii*, *P. aeruginosa*) **IC_{50} 10 μM** (HTB-176)	[73]
504 **505** **506**	*Penicillium* sp. YPGA11	Глубоководный 4500 м	AB	**MIC 32, 8 μg/mL** (*S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 25913) **MIC 16 μg/mL** (*S. aureus* ATCC 25913) **MIC 64, 32 μg/mL** (*S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 25913)	[327]

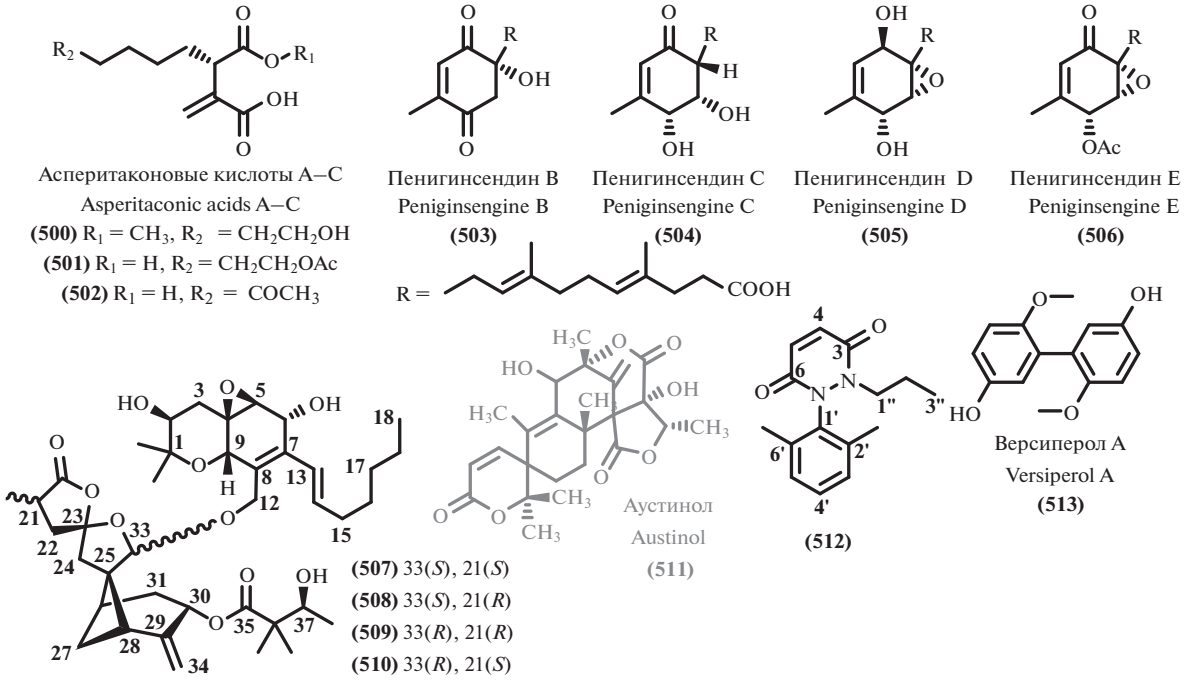


Рис. 34. Меротерпеноиды и другие метаболиты смешанного происхождения.

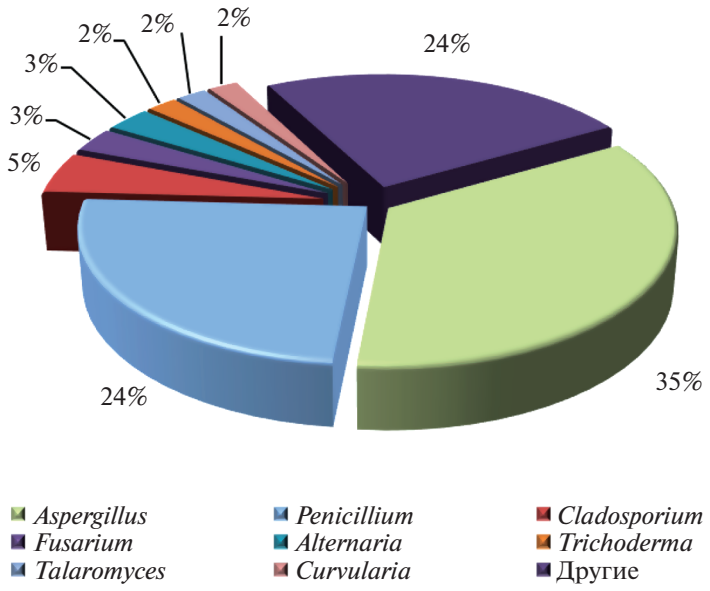


Рис. 35. Распределение экстремофильных микромицетов по родам.

дион (**512**), представляющий собой производное малеинового гидразида, был выделен из мангрового гриба *Aspergillus* sp. AV-2 [170]. Соединения, содержащие N–N связь, довольно редко встречаются среди природных соединений [323], однако широко представлены среди синтетических биологически активных соединений, особенно производных пиридазинов [324].

Из Арктического гриба *Eutypella* sp. D-1 [325] были выделены новые цитотоксические меротерпеноиды, названные эвтипеллацитоспоринами A–D (**507**–**510**). Эти соединения представляют собой конъюгат поликетида (цитоспорина D) и сесквитерпеноидов (деципиенолидов A и B). Небольшая разница в активности эпимеров по C-21 – (**507**) и (**509**) – говорит о слабом влиянии конфигурации этого оптического центра.

Заметную антибактериальную активность проявил описанный меротерпеноид аустинол (**511**) [326] при выделении среди вторичных метаболитов теромофильного гриба рода *Penicillium* [73].

Химическое изучение экстракта глубоководного гриба *Penicillium* sp.YPGA11 [327] привело к выделению четырех новых антибактериальных меротерпеноидов фарнезилциклогексенонов, пенигинсенгинов B–E (**503**–**506**), содержащих редкие для природных соединений мотивы – 1-метилциклогексеновый цикл и (4*E*,8*E*)-4,8-диметилдека-4,8-диеновую кислоту.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск новых антибиотиков является все более актуальной задачей в условиях распространения резистентности. Для поиска природных биологически активных соединений в разные периоды применялись различные стратегии. Наиболее продуктивной была Ваксмановская платформа (Waksman Platform), заключающаяся в культивировании почвенных микроорганизмов с широким спектром антибиотической активности [331]. Этот подход позволил выделить большинство известных на текущий момент антибиотиков, в т.ч. применяемые в медицине и ветеринарии. Однако шансы обнаружения новых соединений таким методом после 1970-х годов стали ничтожно малы из-за проблемы переоткрытия известных антибиотиков (re-discovery problem). При этом потребность в новых антибиотических агентах только растет из-за распространения резистентности, что привело к возникновению целого ряда альтернативных подходов: омиксные методы (метаболомика, геномика, обратная геномика), мишень-ориентированный высокопроизводительный скрининг [1]. Тем не менее, ни одна из разработанных стратегий не привела к прорыву в области поиска антибиотиков.

Одим из путей преодоления кризиса в поиске природных соединений является изучение труднокультивируемых и редких микроорганизмов, в том числе и обитателей экстремальных эониш [332, 333]. Для оценки перспектив этого подхода мы провели анализ всех вторичных метаболитов экстремальных микромицетов, новых или обладающих антибиотической активностью, выделенных за период 2018–2019 годов.

С таксономической точки зрения большинство микромицетов, ставших источниками новых и/или известных активных соединений, принадлежат к распространенным родам *Aspergillus* и *Pen-*



Рис. 36. Структурные семейства метаболитов, выделенных из экстремофильных микромицетов.

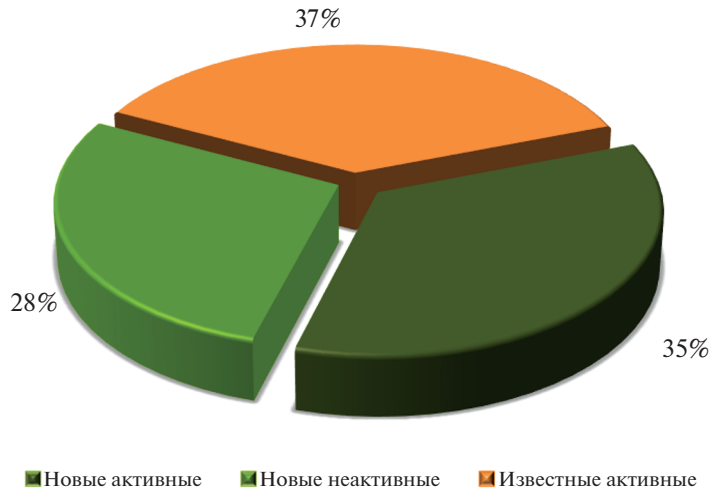


Рис. 37. Анализ активности новых и ранее описанных метаболитов экстремофильных микромицетов.

icillium, представители прочих таксонов имеют намного меньшие доли.

С биогенетической точки зрения, большая часть метаболитов оказались поликетидами (45%) различного строения. Пептиды и родственные соединения оказались очень редкими для экстремофильных микромицетов (5%). Распределение метаболитов по структурным семействам представлено на рис. 36.

Из всех соединений (513), для которых была установлена структура в охваченный период, около 1/3 соединений оказались ранее описанными антибиотиками (190, 37%), для некоторых из них был уточнен спектр биологической активности. Из ранее неописанных метаболитов, составивших 63% (323) от общего числа, антибиотическую активность проявили около 55% (179). При этом из числа всех активных метаболитов (369) новыми оказались около 1/2. Можно предположить, что данная статистика охватывает не все известные антибиотики, выделенные в изученный период, так как в случае выделения только известных соединений данные часто не доходят до публикации.

Несмотря на небольшой временной период охвата литературы (2018–2019), ряд упомянутых в обзоре новых природных соединений стал объектом полного синтеза. В частности, пептаиболы ли-

повелутиболы B (**24**), D (**26**) и их липофильные аналоги были получены твердофазным методом [334]. Терпеноиды инсуликолид (**354**), 14-*O*-ацетилинсуликолид (**355**) и их аналоги синтезированы путем энантиоселективной металл-катализируемой сборки дриманового ядра с последующей окислительной деструкцией и функционализацией [335]. Следует также упомянуть встречный синтез индольного алкалоида миссзртина A (**294**) [241].

Исходя из обобщенных данных, можно сделать вывод, что несмотря на существенное количество новых вторичных метаболитов, выделенных из экстремофильных микромицетов, доля известных антибиотических соединений остается высокой. То есть, само по себе изучение экстремальных и труднодоступных местобитаний не решает проблему переоткрытия известных антибиотиков. Многие из известных соединений, выделенных в результате скрининга по биоактивности, были получены из разных продуцентов множество раз. Например, антибиотический антрахинон эмодин **35** был наработан и охарактеризован 7 раз только за рассмотренный период [61, 73–79]. Применение современных омиксных подходов, стратегий приоритизации и дерепликации [336] может существенно увеличить эффективность изучения природных соединений, в том числе и из экстремофильных эконишь, так как позволит избежать перерасхода ресурсов на выделение известных соединений. В таком случае, с учетом высокого разнообразия химических структур и спектров биологической активности вторичных метаболитов экстремофильных микроорганизмов, они могут иметь высокий потенциал в качестве источников новых лекарственных средств.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-14-50448.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ribeiro da Cunha, Fonseca, Calado* // Antibiotics. 2019. V. 8. P. 45. https://doi.org/10.3390/antibiotics8020045
2. *Dougan G., Dowson C., Overington J.* // Drug Discovery Today. 2019. V. 24. P. 452–461. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.11.015
3. Политическая декларация заседания высокого уровня Генеральной Ассамблеи по проблеме устойчивости к противомикробным препаратам / Резолюция Организации Объединенных Наций A/RES/71/3 (принята 05.10.2016 г.); https://undocs.org/ru/A/RES/71/3.
4. Глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам / Всемирная Организация Здравоохранения: Женева, 2015. С. 15–29.
5. Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года / Распоряжение Правительства Российской Федерации от 25 сентября 2017 г. № 2045-р. С. 2–14
6. *Newman D.J., Cragg G.M.* // Journal of Natural Products. 2020. V. 83. P. 770–803. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285
7. *Sayed A.M., Hassan M.H.A., Alhadrami H.A., Hassan H.M., Goodfellow M., Rateb M.E.* // Journal of Applied Microbiology. 2019. P. jam.14386. https://doi.org/10.1111/jam.14386
8. *Keller N.P.* // Nature Reviews Microbiology. 2019. V. 17. P. 167–180. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1
9. *Schueffler A., Anke T.* // Nat. Prod. Rep. 2014. V. 31. P. 1425–1448. https://doi.org/10.1039/C4NP00060A
10. *Zhang X., Li S.-J., Li J.-J., Liang Z.-Z., Zhao C.-Q.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 194. https://doi.org/10.3390/md16060194
11. *Wickneswary N., Abu Bakar M., Khalid R.* // Malaysian Journal of Chemistry. 2016. V. 18. P. 100–105.
12. *Tian Y., Li Y.-L., Zhao F.-C.* // Marine Drugs. 2017. V. 15. P. 28. https://doi.org/10.3390/md15030028
13. *Stierle A.A., Stierle D.B.* // Natural Product Communications. 2014. V. 9. P. 1037–1044. https://doi.org/10.1177/1934578X1400900738
14. *Corral P., Amoozegar M.A., Ventosa A.* // Marine Drugs. 2019. V. 18. P. 33. https://doi.org/10.3390/md18010033
15. *Tiquia-Arashiro S.M., Grube M.* Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance / Ed. Springer International Publishing, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19030-9
16. *Giddings L.-A., Newman D.J.* Bioactive Compounds from Extremophilic Marine Fungi. In Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance / Tiquia-Arashiro S.M., Grube M., Eds. Springer International Publishing, 2019. P. 349–382. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19030-9_18
17. *Zhang X., Li S.-J., Li J.-J., Liang Z.-Z., Zhao C.-Q.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 194. https://doi.org/10.3390/md16060194

18. *Gribble G.* // Marine Drugs. 2015. V. 13. P. 4044–4136. https://doi.org/10.3390/md13074044
19. *Xu L., Meng W., Cao C., Wang J., Shan W., Wang Q.* // Marine Drugs. 2015. V. 13. P. 3479–3513. https://doi.org/10.3390/md13063479
20. *Jin L., Quan C., Hou X., Fan S.* // Marine Drugs. 2016. V. 14. P. 76. https://doi.org/10.3390/md14040076
21. *Ma H.-G., Liu Q., Zhu G.-L., Liu H.-S., Zhu W.-M.* // Journal of Asian Natural Products Research. 2016. V. 18. P. 92–115. https://doi.org/10.1080/10286020.2015.1127230
22. *Fouillaud M., Venkatachalam M., Girard-Valenciennes E., Caro Y., Dufossé L.* // Marine Drugs. 2016. V. 14. P. 64. https://doi.org/10.3390/md14040064
23. *Imhoff J.* // Marine Drugs. 2016. V. 14. P. 19. https://doi.org/10.3390/md14010019
24. *El-Hossary E.M., Cheng C., Hamed M.M., El-Sayed Hamed A.N., Ohlsen K., Hentschel U., Abdelmohsen U.R.* // European Journal of Medicinal Chemistry. 2017. V. 126. P. 631–651. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.11.022
25. *Nicoletti R., Salvatore M., Andolfi A.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 12. https://doi.org/10.3390/md16010012
26. *Tortorella E., Tedesco P., Palma Esposito F., January G., Fani R., Jaspars M., Pascale D. de* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 355. https://doi.org/10.3390/md16100355
27. *Ancheeva E., Daletos G., Proksch P.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 319. https://doi.org/10.3390/md16090319
28. *Rai M., Gade A., Zimowska B., Ingle A.P., Ingle P.* // Applied Microbiology and Biotechnology. 2018. V. 102. P. 9053–9066. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9329-2
29. *Deshmukh S.K., Prakash V., Ranjan N.* // Frontiers in Microbiology. 2018. V. 8. P. 2536. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02536
30. *Wang K.-W., Ding P.* // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2018. V. 18. P. 1072–1094. https://doi.org/10.2174/1389557518666180305160856
31. *Barone, Varrella, Tangherlini, Rastelli, Dell'Anno, Danovaro, Corinaldesi* // Diversity. 2019. V. 11. P. 113. https://doi.org/10.3390/d11070113
32. *Youssef F.S., Ashour M.L., Singab A.N.B., Wink M.* // Marine Drugs. 2019. V. 17. P. 559. https://doi.org/10.3390/md17100559
33. *Carroll A.R., Copp B.R., Davis R.A., Keyzers R.A., Prinsep M.R.* // Natural Product Reports. 2019. V. 36. P. 122–173. https://doi.org/10.1039/c8np00092a
34. *Sun W., Wu W., Liu X., Zaleta-Pinet D.A., Clark B.R.* // Marine Drugs. 2019. V. 17. P. 339. https://doi.org/10.3390/md17060339
35. *Zain ul Arifeen M., Ma Y.-N., Xue Y.-R., Liu C.-H.* // Marine Drugs. 2019. V. 18. P. 9. https://doi.org/10.3390/md18010009
36. *Luo M., Zang R., Wang X., Chen Z., Song X., Ju J., Huang H.* // Journal of Natural Products. 2019. V. 82. P. 2594–2600. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00545
37. *Youssef D., Alahdal A.* // Molecules. 2018. V. 23. P. 394. https://doi.org/10.3390/molecules23020394
38. *Adamczeski M., Reed A.R., Crews P.* // Journal of Natural Products. 1995. V. 58. P. 201–208. https://doi.org/10.1021/np50116a007
39. *Ван Г., Дау Ш., Чен М., Ву Х., Шу Л., Люо С., Ли С.* // Химия природных соединений. 2010. Т. 46, № 4. С. 491–493.
40. *Liu C.-C., Zhang Z.-Z., Feng Y.-Y., Gu Q.-Q., Li D.-H., Zhu T.-J.* // Natural Product Research. 2019. V. 33. P. 414–419. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1455045
41. *Guimarães D.O., Borges W.S., Vieira N.J., Oliveira L.F. de, Silva C.H.T.P. da, Lopes N.P., Dias L.G., Durán-Patrón R., Collado I.G., Pupo M.T.* // Phytochemistry. 2010. V. 71. P. 1423–1429. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.012
42. *Frank M., Özkaya F., Müller W., Hamacher A., Kassack M., Lin W., Liu Z., Proksch P.* // Marine Drugs. 2019. V. 17. P. 99. https://doi.org/10.3390/md17020099
43. *Kimura Y., Tani K., Kojima A., Sotoma G., Okada K., Shimada A.* // Phytochemistry. 1996. V. 41. P. 665–669. https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00693-1
44. *Li W., Luo D., Huang J., Wang L., Zhang F., Xi T., Liao J., Lu Y.* // Natural Product Research. 2018. V. 32. P. 662–667. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1335730
45. *Hodge R.P., Harris C.M., Harris T.M.* // Journal of Natural Products. 1988. V. 51. P. 66–73. https://doi.org/10.1021/np50055a008
46. *Niu S., Xia M., Chen M., Liu X., Li Z., Xie Y., Shao Z., Zhang G.* // Marine Drugs. 2019. V. 17. P. 686. https://doi.org/10.3390/md17120686
47. *Niu S., Wang N., Xie C.-L., Fan Z., Luo Z., Chen H.-F., Yang X.-W.* // The Journal of Antibiotics. 2018. V. 71. P. 658–661. https://doi.org/10.1038/s41429-018-0046-y
48. *Kopp B., Rehm H.J.* // European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. 1979. V. 6. P. 397–401. https://doi.org/10.1007/BF00499170
49. *Du L., Li D., Zhu T., Cai S., Wang F., Xiao X., Gu Q.* // Tetrahedron. 2009. V. 65. P. 1033–1039. https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.11.078
50. *Kawai K., Nozawa K., Nakajima S., Iitaka Y.* // Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 1984. V. 32. P. 94–98. https://doi.org/10.1248/cpb.32.94
51. *Yang B., Sun W., Wang J., Lin S., Li X.-N., Zhu H., Luo Z., Xue Y., Hu Z., Zhang Y.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 110. https://doi.org/10.3390/md16040110
52. *Du L., Yang X., Zhu T., Wang F., Xiao X., Park H., Gu Q.* // Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 2009. V. 57. P. 873–876. https://doi.org/10.1248/cpb.57.873

53. *Zhong W., Wang J., Wei X., Chen Y., Fu T., Xiang Y., Huang X., Tian X., Xiao Z., Zhang W., Zhang S., Long L., Wang F.* // Organic Letters. 2018. V. 20. P. 4593–4596. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b01880
54. *Wang W., Wan X., Liu J., Wang J., Zhu H., Chen C., Zhang Y.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 150. https://doi.org/10.3390/md16050150
55. *Zhang M., Wang W.-L., Fang Y.-C., Zhu T.-J., Gu Q.-Q., Zhu W.-M.* // Journal of Natural Products. 2008. V. 71. P. 985–989. https://doi.org/10.1021/np700737g
56. *Singh V.P., Yedukondalu N., Sharma V., Kushwaha M., Sharma R., Chaubey A., Kumar A., Singh D., Vishwakarma R.A.* // Journal of Natural Products. 2018. V. 81. P. 219–226. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00873
57. *Rogozhin E., Sadykova V., Baranova A., Vasilchenko A., Lushpa V., Mineev K., Georgieva M., Kul'ko A., Krasheninnikov M., Lyundup A., Vasilchenko A., Andreev Y.* // Molecules. 2018. V. 23. P. 2785. https://doi.org/10.3390/molecules23112785
58. *Fdhila F., Vázquez V., Sánchez J.L., Riguera R.* // Journal of Natural Products. 2003. V. 66. P. 1299–1301. https://doi.org/10.1021/np030233e
59. *Guo C., Lin X.-P., Liao S.-R., Yang B., Zhou X.-F., Yang X.-W., Tian X.-P., Wang J.-F., Liu Y.-H.* // Natural Product Research. 2019. P. 1–9. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1553880
60. *Zhao D.-L., Wang D., Tian X.-Y., Cao F., Li Y.-Q., Zhang C.-S.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 36. https://doi.org/10.3390/md16010036
61. *Wang W., Chen R., Luo Z., Wang W., Chen J.* // Natural Product Research. 2018. V. 32. P. 558–563. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1329732
62. *Bode H.B., Bethe B., Höfs R., Zeeck A.* // ChemBioChem. 2002. V. 3. P. 619–627. https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020703)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9
63. *Yang S.-Q., Li X.-M., Xu G.-M., Li X., An C.-Y., Wang B.-G.* // The Journal of Antibiotics. 2018. V. 71. P. 778–784. https://doi.org/10.1038/s41429-018-0063-x
64. *Hatsuda Y., Hamasaki T., Ishida M., Yoshikawa S.* // Agricultural and Biological Chemistry. 1969. V. 33. P. 131–133. https://doi.org/10.1080/00021369.1969.10859290
65. *Endale M., Ekberg A., Alao J., Akala H., Ndakala A., Sunnerhagen P., Erdélyi M., Yenesew A.* // Molecules. 2012. V. 18. P. 311–321. https://doi.org/10.3390/molecules18010311
66. *Chung M.-I., Jou S.-J., Cheng T.-H., Lin C.-N., Ko F.-N., Teng C.-M.* // Journal of Natural Products. 1994. V. 57. P. 313–316. https://doi.org/10.1021/np50104a020
67. *Moon M.K., Han Y.-M., Lee Y.-J., Lee L.H., Yang J.H., Kwon B.-M., Kim D.K.* // Archives of Pharmacal Research. 2010. V. 33. P. 1747–1751. https://doi.org/10.1007/s12272-010-1106-4
68. *Ян Л., Сень З., Ли Ж.-Х., Пань Й.-М.* // Химия природных соединений. 2016. Т. 52. № 5. С. 760–761.
69. *Wells J.M., Cole R.J., Kirksey J.W.* // Applied Microbiology. 1975. V. 30. P. 26–28.
70. *Liu D., Yan L., Ma L., Huang Y., Pan X., Liu W., Lv Z.* // Archives of Pharmacal Research. 2015. V. 38. P. 1038–1043. https://doi.org/10.1007/s12272-014-0371-z
71. *May Zin W.W., Buttachon S., Dethoup T., Pereira J.A., Gales L., Inácio Â., Costa P.M., Lee M., Sekeroglu N., Silva A.M.S., Pinto M.M.M., Kijjoa A.* // Phytochemistry. 2017. V. 141. P. 86–97. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.05.015
72. *Hawas U.W., El-Beih A.A., El-Halawany A.M.* // Archives of Pharmacal Research. 2012. V. 35. P. 1749–1756. https://doi.org/10.1007/s12272-012-1006-x
73. *Orfali R., Perveen S.* // Journal of Chemistry. 2019. V. 2019. P. 1–7. https://doi.org/10.1155/2019/7162948
74. *Саид Г., Хоу Ш.-М., Лю Ш., Чао Ж., Дзян Я.-Я., Жен Дж.-Е., Шао Ч.-Л.* // Химия природных соединений. 2019. Т. 55. № 3. С. 457–459.
75. *Song Z., Liu Y., Gao J., Hu J., He H., Dai S., Wang L., Dai H., Zhang L., Song F.* // Natural Product Research. 2019. P. 1–8. https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1660331
76. *Fang W., Wang J., Wang J., Shi L., Li K., Lin X., Min Y., Yang B., Tang L., Liu Y., Zhou X.* // Journal of Natural Products. 2018. V. 81. P. 1405–1410. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00015
77. *Wang W., Gao M., Luo Z., Liao Y., Zhang B., Ke W., Shao Z., Li F., Chen J.* // Natural Product Research. 2019. V. 33. P. 3077–3082. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1519561
78. *Song T., Chen M., Chai W., Zhang Z., Lian X.-Y.* // Tetrahedron. 2018. V. 74. P. 884–891. https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.01.015
79. *Buttachon S., Ramos A., Inácio Â., Dethoup T., Gales L., Lee M., Costa P., Silva A., Sekeroglu N., Rocha E., Pinto M., Pereira J., Kijjoa A.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 119. https://doi.org/10.3390/md16040119
80. *Danielsen K., Aksnes D.W., Francis G.W.* // Magnetic Resonance in Chemistry. 1992. V. 30. P. 359–360. https://doi.org/10.1002/mrc.1260300414
81. *Lee M.S., Cha E.Y., Sul J.Y., Song I.S., Kim J.Y.* // Phytotherapy Research. 2011. V. 25. P. 833–837. https://doi.org/10.1002/ptr.3323
82. *Semple S.J., Pyke S.M., Reynolds G.D., Flower R.L.P.* // Antiviral Research. 2001. V. 49. P. 169–178. https://doi.org/10.1016/S0166-3542(01)00125-5
83. *Li J.L., Jiang X., Liu X., He C., Di Y., Lu S., Huang H., Lin B., Wang D., Fan B.* // Fitoterapia. 2019. V. 133. P. 1–4. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.11.015
84. *Lee Y.M., Li H., Hong J., Cho H.Y., Bae K.S., Kim M.A., Kim D.-K., Jung J.H.* // Archives of Pharmacal Research. 2010. V. 33. P. 231–235. https://doi.org/10.1007/s12272-010-0207-4
85. *Liu K., Zheng Y., Miao C., Xiong Z., Xu L., Guan H., Yang Y., Zhao L.* // Natural Product Research. 2014.

V. 28. P. 2334–2337.
https://doi.org/10.1080/14786419.2014.935941

86. *Sedmera P., Volc J., Weijer J., Vokoun J., Musílek V.* // Collection of Czechoslovak Chemical Communications. 1981. V. 46. P. 1210–1216.
https://doi.org/10.1135/cccc19811210

87. *Pang X., Lin X., Wang P., Zhou X., Yang B., Wang J., Liu Y.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 280.
https://doi.org/10.3390/md16080280

88. *Zhao D.-L., Cao F., Wang C.-Y., Yang L.-J., Shi T., Wang K.-L., Shao C.-L., Wang C.-Y.* // Journal of Natural Products. 2019. V. 82. P. 3201–3204.
https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00905

89. *Boutin B., Peeler J., Twedt R.* // Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. 1989. V. 26. P. 75–81.
https://doi.org/10.1080/15287398909531234

90. *Gao S.-S., Li X.-M., Wang B.-G.* // Natural Product Communications. 2009. V. 4. P. 1934578X0900401.
https://doi.org/10.1177/1934578X0900401107

91. *Okuno T., Natsume I., Sawai K., Sawamura K., Furusaki A., Matsumoto T.* // Tetrahedron Letters. 1983. V. 24. P. 5653–5656.
https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)94165-0

92. *Kornsakulkarn J., Dolsophon K., Boonyuen N., Boonruangprapa T., Rachtawee P., Prabpai S., Kongsaeree P., Thongpanchang C.* // Tetrahedron. 2011. V. 67. P. 7540–7547.
https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.07.078

93. *Supratman U., Hirai N., Sato S., Watanabe K., Malik A., Annas S., Harneti D., Maharani R., Koseki T., Shiono Y.* // Natural Product Research. 2019. P. 1–7.
https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1650358

94. *Li Q., Zhu R., Yi W., Chai W., Zhang Z., Lian X.-Y.* // Phytochemistry. 2018. V. 152. P. 53–60.
https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.04.021

95. *Bashyal B.P., Wellensiek B.P., Ramakrishnan R., Faeth S.H., Ahmad N., Gunatilaka A.A.L.* // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2014. V. 22. P. 6112–6116.
https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.08.039

96. *Zhu A., Zhang X.-W., Zhang M., Li W., Ma Z.-Y., Zhu H.-J., Cao F.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 312.
https://doi.org/10.3390/md16090312

97. *Zhu A., Yang M.-Y., Zhang Y.-H., Shao C.-L., Wang C.-Y., Hu L.-D., Cao F., Zhu H.-J.* // Scientific Reports. 2018. V. 8. P. 10621.
https://doi.org/10.1038/s41598-018-28996-5

98. *González-Andrade M., Rivera-Chávez J., Sosa-Peinado A., Figueroa M., Rodríguez-Sotres R., Mata R.* // Journal of Medicinal Chemistry. 2011. V. 54. P. 3875–3884.
https://doi.org/10.1021/jm200167g

99. *Figueroa M., González M. del C., Rodríguez-Sotres R., Sosa-Peinado A., González-Andrade M., Cerda-García-Rojas C.M., Mata R.* // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2009. V. 17. P. 2167–2174.
https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.10.079

100. *Song Z., Gao J., Hu J., He H., Huang P., Zhang L., Song F.* // Natural Product Research. 2019. P. 1–6.
https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1597355

101. *Maes C.M., Steyn P.S.* // Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1. 1984. P. 1137.
https://doi.org/10.1039/p19840001137

102. *Putra H.N., Rukachaisirikul V., Saithong S., Phongpaichit S., Preedanon S., Sakayaroj J., Hadsadee S., Jungsuttiwong S.* // Tetrahedron. 2019. V. 75. P. 130530.
https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.130530

103. *Shimada A., Takahashi I., Kawano T., Kimura Y.* // Zeitschrift für Naturforschung. 2001. V. 56b. P. 797–803.
https://doi.org/10.1515/znb-2001-0813

104. *Hamasaki T., Sato Y., Hatsuda Y.* // Agricultural and Biological Chemistry. 1975. V. 39. P. 2341–2345.
https://doi.org/10.1080/00021369.1975.10861955

105. *Sun R.-R., Miao F.-P., Zhang J., Wang G., Yin X.-L., Ji N.-Y.* // Magnetic Resonance in Chemistry. 2013. V. 51. P. 65–68.
https://doi.org/10.1002/mrc.3903

106. *Trisuwan K., Rukachaisirikul V., Kaewpet M., Phongpaichit S., Hutadilok-Towatana N., Preedanon S., Sakayaroj J.* // Journal of Natural Products. 2011. V. 74. P. 1663–1667.
https://doi.org/10.1021/np200374j

107. *Elnaggar M.S., Ebada S.S., Ashour M.L., Ebrahim W., Müller W.E.G., Mándi A., Kurtán T., Singab A., Lin W., Liu Z., Proksch P.* // Tetrahedron. 2016. V. 72. P. 2411–2419.
https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.03.073

108. *Salendra L., Lin X., Chen W., Pang X., Luo X., Long J., Liao S., Wang J., Zhou X., Liu Y., Yang B.* // Natural Product Research. 2019. P. 1–9.
https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1610757

109. *Wang H., Gloer J.B., Scott J.A., Malloch D.* // Tetrahedron Letters. 1995. V. 36. P. 5847–5850.
https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)01174-G

110. *Khamthong N., Rukachaisirikul V., Phongpaichit S., Preedanon S., Sakayaroj J.* // Tetrahedron. 2012. V. 68. P. 8245–8250.
https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.07.060

111. *Sun Y.-L., Bao J., Liu K.-S., Zhang X.-Y., He F., Wang Y.-F., Nong X.-H., Qi S.-H.* // Planta Medica. 2013. V. 79. P. 1474–1479.
https://doi.org/10.1055/s-0033-1350805

112. *Li X., Zhang L., Liu Y., Guo Z., Deng Z., Chen J., XuanTu, Zou K.* // Natural Product Communications. 2013. V. 8. P. 1934578X1300800.
https://doi.org/10.1177/1934578X1300800510

113. *Luo Y.-P., Zheng C.-J., Chen G.-Y., Song X.-P., Wang Z.* // The Journal of Antibiotics. 2019. V. 72. P. 513–517.
https://doi.org/10.1038/s41429-019-0178-8

114. *Kumla D., Pereira J., Dethoup T., Gales L., Freitas-Silva J., Costa P., Lee M., Silva A., Sekeroglu N., Pinto M., Kijjoa A.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 289.
https://doi.org/10.3390/md16080289

115. *Fujita K.-I., Nagamine Y., Ping X., Taniguchi M.* // The Journal of Antibiotics. 1999. V. 52. P. 628–634.
https://doi.org/10.7164/antibiotics.52.628

116. *Wang L., Han X., Zhu G., Wang Y., Chairoungdua A., Piyachaturawat P., Zhu W.* // Frontiers in Chemistry.

2018. V. 6. P. 344.
https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00344

117. *Zhao G.-Y., Fan J.-Y., Hua C.-P., Yan W., Chen C.-J., Lu Y.-H., Jiao R.-H., Tan R.-X.* // RSC Advances. 2015. V. 5. P. 5657–5663.
https://doi.org/10.1039/C4RA12851F

118. *Chen L., Li Y.-P., Li X.-X., Lu Z.-H., Zheng Q.-H., Liu Q.-Y.* // The Journal of Antibiotics. 2019. V. 72. P. 34–44.
https://doi.org/10.1038/s41429-018-0104-5

119. *Kuroba ne I, Ving L., Mcinnes A.* // Secalonic Acids and Their Use. DE 3002761. 1980.

120. *Zhang J., Tao L., Liang Y., Yan Y., Dai C., Xia X., She Z., Lin Y., Fu L.* // Cell Cycle. 2009. V. 8. P. 2444–2450.
https://doi.org/10.4161/cc.8.15.9170

121. *Bai M., Zheng C.-J., Tang D.-Q., Zhang F., Wang H.-Y., Chen G.-Y.* // The Journal of Antibiotics. 2019. V. 72. P. 779–782.
https://doi.org/10.1038/s41429-019-0206-8

122. *Liu F., Cai X.-L., Yang H., Xia X.-K., Guo Z.-Y., Yuan J., Li M.-F., She Z.-G., Lin Y.-C.* // Planta Medica. 2010. V. 76. P. 185–189.
https://doi.org/10.1055/s-0029-1186047

123. *Lenta B.N., Ngatchou J., Frese M., Ladoh-Yemeda F., Voundi S., Nardella F., Michalek C., Wibberg D., Ngouela S., Tsamo E., Kaiser M., Kalinowski J., Sewald N.* // Zeitschrift für Naturforschung B. 2016. V. 71. P. 1159–1167.
https://doi.org/10.1515/znb-2016-0128

124. *Zheng C.-J., Liao H.-X., Mei R.-Q., Huang G.-L., Yang L.-J., Zhou X.-M., Shao T.-M., Chen G.-Y., Wang C.-Y.* // Natural Product Research. 2019. V. 33. P. 1127–1134.
https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1460832

125. *Inamori Y., Kato Y., Kubo M., Kamiki T., Takemoto T., Nomoto K.* // Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 1983. V. 31. P. 4543–4548.
https://doi.org/10.1248/cpb.31.4543

126. *Tao Q., Ding C., Auckloo B.N., Wu B.* // Natural Product Communications. 2018. V. 13. P. 571–573.
https://doi.org/10.1177/1934578X1801300514

127. *Lu C.-H., Huang Y.-J., Shen Y.-M.* // Chinese Journal of Natural Medicines. 2005. V. 3. P. 269–271.

128. *Ukwatta K.M., Lawrence J.L., Wijayarathna C.D.* // Mycology. 2019. V. 10. P. 222–228.
https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1620892

129. *Capon R.J., Stewart M., Ratnayake R., Lacey E., Gill J.H.* // Journal of Natural Products. 2007. V. 70. P. 1746–1752.
https://doi.org/10.1021/np0702483

130. *He F., Li X., Yu J.-H., Zhang X., Nong X., Chen G., Zhu K., Wang Y.-Y., Bao J., Zhang H.* // Fitoterapia. 2019. V. 136. P. 104177.
https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104177

131. *Bladt T., Frisvad J., Knudsen P., Larsen T.* // Molecules. 2013. V. 18. P. 11338–11376.
https://doi.org/10.3390/molecules180911338

132. *Xia X.-K., Huang H.-R., She Z.-G., Cai J.-W., Lan L., Zhang J.-Y., Fu L.-W., Vrijmoed L.L.P., Lin Y.-C.* // Helvetica Chimica Acta. 2007. V. 90. P. 1925–1931.
https://doi.org/10.1002/hlca.200790200

133. *De Stefano S., Nicoletti R., Milone A., Zambardino S.* // Phytochemistry. 1999. V. 52. P. 1399–1401.
https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00320-9

134. *Stammati A., Nicoletti R., De Stefano S., Zampaglioni F., Zucco F.* // Alternatives to Laboratory Animals. 2002. V. 30. P. 69–75.
https://doi.org/10.1177/026119290203000107

135. *Noor A.O., Almasri D.M., Bagalagel A.A., Abdallah H.M., Mohamed S.G.A., Mohamed G.A., Ibrahim S.R.M.* // Molecules. 2020. V. 25. P. 395.
https://doi.org/10.3390/molecules25020395

136. *Chen Y., Liu Z., Liu H., Pan Y., Li J., Liu L., She Z.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 54.
https://doi.org/10.3390/md16020054

137. *Li C., Gong B., Cox D., Li C., Wang J., Ding W.* // Pharmacognosy Magazine. 2014. V. 10. P. 153.
https://doi.org/10.4103/0973-1296.127367

138. *Aly A.H., Edrada-Ebel R., Wray V., Müller W.E.G., Kozytska S., Hentschel U., Proksch P., Ebel R.* // Phytochemistry. 2008. V. 69. P. 1716–1725.
https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.013

139. *Wensheng L., Jiaxin X., Fenqi L., Li X., Chunyuan L.* // Pharmacognosy Magazine. 2016. V. 12. P. 259–261.
https://doi.org/10.4103/0973-1296.192204

140. *Larsen T.O., Breinholt J.* // Journal of Natural Products. 1999. V. 62. P. 1182–1184.
https://doi.org/10.1021/np990066b

141. *Xu Z., Xiong B., Xu J.* // Natural Product Research. 2019. P. 1–5.
https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1656624

142. *Chen S., Liu Y., Liu Z., Cai R., Lu Y., Huang X., She Z.* // RSC Advances. 2016. V. 6. P. 26412–26420.
https://doi.org/10.1039/C6RA02566H

143. *Aly A.H., Edrada-Ebel R., Indriani I.D., Wray V., Müller W.E.G., Totzke F., Zirrgiebel U., Schächtele C., Kubbutat M.H.G., Lin W.H., Proksch P., Ebel R.* // Journal of Natural Products. 2008. V. 71. P. 972–980.
https://doi.org/10.1021/np070447m

144. *Kim N., Sohn M.-J., Koshino H., Kim E.-H., Kim W.-G.* // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2014. V. 24. P. 83–86.
https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.11.071

145. *Xu Z., Wu X., Li G., Feng Z., Xu J.* // Natural Product Research. 2019. P. 1–6.
https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1539980

146. *Wang Y., Yang M.-H., Wang X.-B., Li T.-X., Kong L.-Y.* // Fitoterapia. 2014. V. 99. P. 153–158.
https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.09.015

147. *Souza G. de, Mithöfer A., Daolio C., Schneider B., Rodrigues-Filho E.* // Molecules. 2013. V. 18. P. 2528–2538.
https://doi.org/10.3390/molecules18032528

148. *Jiao P., Gloer J.B., Campbell J., Shearer C.A.* // Journal of Natural Products. 2006. V. 69. P. 612–615.
https://doi.org/10.1021/np0504661

149. *Хань Ж., Мэй В., Жао Е., Дэн Ю., Дай Х.* // Химия природных соединений. 2009. Т. 45. № 6. С. 676–677.

150. *Wang X., Radwan M.M., Taráwneh A.H., Gao J., Wedge D.E., Rosa L.H., Cutler H.G., Cutler S.J.* // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2013. V. 61. P. 4551–4555. https://doi.org/10.1021/jf400212y

151. *Afiyatullov S.S., Zhuravleva O.I., Antonov A.S., Leshchenko E.V., Pivkin M.V., Khudyakova Y.V., Denisenko V.A., Pislyagin E.A., Kim N.Y., Berdyshev D.V., Amsberg G. von, Dyshlovoy S.A.* // Marine Drugs. 2019. V. 17. P. 647. https://doi.org/10.3390/md17110647

152. *Zhang F.-Z., Li X.-M., Yang S.-Q., Meng L.-H., Wang B.-G.* // Journal of Natural Products. 2019. V. 82. P. 1535–1541. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b01091

153. *Jadulco R., Proksch P., Wray V., Sudarsono, Berg A., Gräfe U.* // Journal of Natural Products. 2001. V. 64. P. 527–530. https://doi.org/10.1021/np000401s

154. *Grabley S., Granzer E., Hütter K., Ludwig D., Mayer M., Thiericke R., Till G., Wink J., Philipps S., Zeeck A.* // The Journal of Antibiotics. 1992. V. 45. P. 56–65. https://doi.org/10.7164/antibiotics.45.56

155. *An F.-L., Liu W.-H., Wei X.-C., Pan Z.-H., Lu Y.-H.* // Natural Product Communications. 2018. V. 13. P. 865–866. https://doi.org/10.1177/1934578X1801300720

156. *Umeokoli B.O., Ebrahim W., El-Neketi M., Müller W.E.G., Kalscheuer R., Lin W., Liu Z., Proksch P.* // Natural Product Research. 2019. V. 33. P. 2215–2222. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1496430

157. *Abdou R., Scherlach K., Dahse H.-M., Sattler I., Hertweck C.* // Phytochemistry. 2010. V. 71. P. 110–116. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.09.024

158. *Aldridge D.C., Galt S., Giles D., Turner W.B.* // Journal of the Chemical Society C: Organic. 1971. P. 1623. https://doi.org/10.1039/j39710001623

159. *Xia M.-W., Yang Y., Xu R., Li C.-W., Cui C.-B.* // Natural Product Research. 2019. V. 33. P. 89–94. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1434644

160. *Carvalho M.R., Barbosa L.C. de A., Queiróz J.H. de, Howarth O.W.* // Tetrahedron Letters. 2001. V. 42. P. 809–811. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)02154-7

161. *Zhao D.-L., Shao C.-L., Zhang Q., Wang K.-L., Guan F.-F., Shi T., Wang C.-Y.* // Journal of Natural Products. 2015. V. 78. P. 2310–2314. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00575

162. *Hayasaka S., Koseki T., Murayama T., Kwon E., Shiono Y.* // Zeitschrift für Naturforschung B. 2011. V. 66. P. 961–964. https://doi.org/10.1515/znb-2011-0915

163. *Юрченко А. Н., Сметанина О. Ф., Калиновский А. И., Пивкин М. В., Дмитренок П. С., Кузнецова Т. А.* // Известия Академии наук. Серия химическая. 2010. Т. 59. № 4. С. 834–838.

164. *Chokpaiboon S., Unagul P., Nithithanasilp S., Komwijit S., Somyong W., Ratiarpakul T., Isaka M., Bunyapaiboonsri T.* // Natural Product Research. 2018. V. 32. P. 149–153. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1342083

165. *Zheng C.-J., Huang G.-L., Liao H.-X., Mei R.-Q., Luo Y.-P., Chen G.-Y., Zhang Q.-Y.* // Bioorganic Chemistry. 2019. V.85. P. 382–385. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.01.015

166. *Хуан Ж., Гуо Ж., Ян Ж., Йин С., Ли С., Луо В., Шэ Ж., Линь Е.* // Химия природных соединений. 2009. Т. 45. № 5. С. 528–530.

167. *Kornsakulkarn J., Somyong W., Supothina S., Boonyuen N., Thongpanchang C.* // Tetrahedron. 2015. V. 71. P. 9112–9116. https://doi.org/10.1016/j.tet.2015.10.015

168. *Beekman A.M., Barrow R.A.* // Australian Journal of Chemistry. 2015. V. 68. P. 1583. https://doi.org/10.1071/CH15144

169. *Matsuo H., Nonaka K., Nagano Y., Yabuki A., Fujikura K., Takahashi Y., Ōmura S., Nakashima T.* // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2018. V. 82. P. 1323–1326. https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1467264

170. *Elissawy A.M., Ebada S.S., Ashour M.L., El-Neketi M., Ebrahim W., Singab A.B.* // Phytochemistry Letters. 2019. V. 29. P. 1–5. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.10.014

171. *Ishikawa Y., Morimoto K., Hamasaki T.* // Journal of the American Oil Chemists' Society. 1984. V. 61. P. 1864–1868. https://doi.org/10.1007/BF02540819

172. *Zhang Z., He X., Liu C., Che Q., Zhu T., Gu Q., Li D.* // RSC Advances. 2016. V. 6. P. 76498–76504. https://doi.org/10.1039/C6RA14640F

173. *Li H.-L., Li X.-M., Mándi A., Antus S., Li X., Zhang P., Liu Y., Kurtán T., Wang B.-G.* // The Journal of Organic Chemistry. 2017. V. 82. P. 9946–9954. https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b01277

174. *Reichling J., Suschke U., Schneele J., Geiss H.K.* // Natural Product Communications. 2006. V. 1. P. 1934578X0600101. https://doi.org/10.1177/1934578X0600101116

175. *Reddy M., Gupta S., Jacob M., Khan S., Ferreira D.* // Planta Medica. 2007. V. 73. P. 461–467. https://doi.org/10.1055/s-2007-967167

176. *Frank M., Hartmann R., Plenker M., Mándi A., Kurtán T., Özkaya F.C., Müller W.E.G., Kassack M.U., Hamacher A., Lin W., Liu Z., Proksch P.* // Journal of Natural Products. 2019. V. 82. P. 2159–2166. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00151

177. *Klaiklay S., Rukachaisirikul V., Tadpetch K., Sukpondma Y., Phongpaichit S., Buatong J., Sakayaroj J.* // Tetrahedron. 2012. V. 68. P. 2299–2305. https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.01.041

178. *Itabashi T., Nozawa K., Nakajima S., Kawai K.* // Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 1993. V. 41. P. 2040–2041. https://doi.org/10.1248/cpb.41.2040

179. *Taniguchi M., Kaneda N., Shibata K., Kamikawa T.* // Agricultural and Biological Chemistry. 1978. V. 42. P. 1629–1630. https://doi.org/10.1080/00021369.1978.10863223

180. *Nuankeaw K., Chaiyosang B., Suebrasri T., Kanokmedhakul S., Lumyong S., Boonlue S.* // Mycoscience. 2020. V. 61. P. 16–21. https://doi.org/10.1016/j.myc.2019.10.001

181. *Yamazaki M., Maebayashi Y.* // Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 1982. V. 30. P. 514–518. https://doi.org/10.1248/cpb.30.514

182. *Chomcheon P., Wiyakrutta S., Sriubolmas N., Ngamrojanavanich N., Mahidol C., Ruchirawat S., Kittakoop P.* // Phytochemistry. 2009. V. 70. P. 121–127. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.10.007

183. *Fang M.J., Fang H., Li W.J., Huang D.M., Wu Z., Zhao Y.F.* // Natural Product Research. 2012. V. 26. P. 1224–1228. https://doi.org/10.1080/14786419.2011.559947

184. *Hargreaves J., Park J., Ghisalberti E.L., Sivasithamparam K., Skelton B.W., White A.H.* // Journal of Natural Products. 2002. V. 65. P. 7–10. https://doi.org/10.1021/np0102758

185. *Fang S.-T., Wang Y.-J., Ma X.-Y., Yin X.-L., Ji N.-Y.* // Natural Product Research. 2019. V. 33. P. 3127–3133. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1522314

186. *Wen S., Fan W., Guo H., Huang C., Yan Z., Long Y.* // Natural Product Research. 2019. P. 1–7. https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1598993

187. *Xu X., Yang H., Xu H., Yin L., Chen Z., Shen H.* // Natural Product Research. 2018. V. 32. P. 821–825. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1363754

188. *Gao H., Zhou L., Cai S., Zhang G., Zhu T., Gu Q., Li D.* // The Journal of Antibiotics. 2013. V. 66. P. 539–542. https://doi.org/10.1038/ja.2013.40

189. *Li X.-B., Zhou Y.-H., Zhu R.-X., Chang W.-Q., Yuan H.-Q., Gao W., Zhang L.-L., Zhao Z.-T., Lou H.-X.* // Chemistry & Biodiversity. 2015. V. 12. P. 575–592. https://doi.org/10.1002/cbdv.201400146

190. *Cooke R.G., Edwards J.M.* Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products / Eds. Herz W., Grisebach H., Kirby G.W. Vienna: Springer Vienna, 1981. 153–190 p. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8611-4_4

191. *Homma K., Fukuyama K., Katsube Y., Kimura Y., Hamasaki T.* // Agricultural and Biological Chemistry. 1980. V. 44. P. 1333–1337. https://doi.org/10.1271/bbb1961.44.1333

192. *Ayer W.A., Hiratsuka Y.* // Revista Latinoamericana de Quimica. 1982. V. 13. P. 84–87.

193. *Ayer W.A., Hoyano Y., Pedras M.S., Altena I. van* // Canadian Journal of Chemistry. 1986. V. 64. P. 1585–1589. https://doi.org/10.1139/v86-262

194. *Tanaka Y., Matsuzaki K., Zhong C.-L., Yoshida H., Kawakubo T., Masuma R., Tanaka H., Omura S.* // The Journal of Antibiotics. 1996. V. 49. P. 1056–1059. https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.1056

195. *Bai Y.-B., Gao Y.-Q., Nie X.-D., Tuong T.-M.-L., Li D., Gao J.-M.* // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2019. V. 67. P. 6125–6132. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00606

196. *Gauthier T., Wang X., Sifuentes Dos Santos J., Fysikopoulos A., Tadrist S., Canlet C., Artigot M.P., Loiseau N., Oswald I.P., Puel O.* // PLoS One. 2012. V. 7. P. e29906. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029906

197. *Gao J.-M., Yang S.-X., Qin J.-C.* // Chemical Reviews. 2013. V. 113. P. 4755–4811. https://doi.org/10.1021/cr300402y

198. *Wang C.-Y., Hao J.-D., Ning X.-Y., Wu J.-S., Zhao D.-L., Kong C.-J., Shao C.-L., Wang C.-Y.* // RSC Advances. 2018. V. 8. P. 4348–4353. https://doi.org/10.1039/C7RA13327H

199. *Pairet L., Wrigley S.K., Chetland I., Reynolds E.E., Hayes M.A., Holloway J., Ainsworth A.M., Katzer W., Cheng X.-M., Hupe D.J., Charlton P., Doherty A.M.* // The Journal of Antibiotics. 1995. V. 48. P. 913–923. https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.913

200. *Luo X., Lin X., Tao H., Wang J., Li J., Yang B., Zhou X., Liu Y.* // Journal of Natural Products. 2018. V. 81. P. 934–941. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b01053

201. *Hemtasin C., Kanokmedhakul S., Moosophon P., Soytong K., Kanokmedhakul K.* // Phytochemistry Letters. 2016. V. 16. P. 56–60. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.03.004

202. *Myobatake Y., Takeuchi T., Kuramochi K., Kuriyama I., Ishido T., Hirano K., Sugawara F., Yoshida H., Mizushina Y.* // Journal of Natural Products. 2012. V. 75. P. 135–141. https://doi.org/10.1021/np200523b

203. *Yang S.-W., Chan T.-M., Terracciano J., Patel R., Patel M., Gullo V., Chu M.* // The Journal of Antibiotics. 2006. V. 59. P. 720–723. https://doi.org/10.1038/ja.2006.96

204. *Trivedi A.B., Hirota M., Doi E., Kitabatake N.* // Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1. 1993. P. 2167. https://doi.org/10.1039/p19930002167

205. *Sadorn K., Saepua S., Boonyuen N., Laksanacharoen P., Rachtawee P., Pittayakhajonwut P.* // RSC Advances. 2016. V. 6. P. 94510–94523. https://doi.org/10.1039/C6RA21898A

206. *Chen S., Wang J., Wang Z., Lin X., Zhao B., Kaliaperumal K., Liao X., Tu Z., Li J., Xu S., Liu Y.* // Fitoterapia. 2017. V. 117. P. 71–78. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.01.005

207. *Vanmiddlesworth F., Giacobbe R.A., Lopez M., Garrity G., Bland J.A., Bartizal K., Fromtling R.A., Polishook J., Zweerink M., Edison A.M., Rozdilsky W., Wilson K.E., Monaghan R.L.* // The Journal of Antibiotics. 1992. V. 45. P. 861–867. https://doi.org/10.7164/antibiotics.45.861

208. *Choi B.-K., Phan T.H.T., Hwang S., Oh D.-C., Kang J.S., Lee H.-S., Ngo T.D.N., Tran T.T.V., Shin H.J.* // Journal of Natural Products. 2019. V. 82. P. 3186–3190. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00776

209. *Neuhaus G.F., Adpressa D.A., Bruhn T., Loesgen S.* // Journal of Natural Products. 2019. V. 82. P. 2780–2789. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00416

210. *Sassa T., Takemura T., Ikeda M., Miura Y.* // Tetrahedron Letters. 1973. V. 14. P. 2333–2334. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)96211-2

211. *Niu S., Tang X.-X., Fan Z., Xia J.-M., Xie C.-L., Yang X.-W.* // Marine Drugs. 2019. V. 17. P. 125. https://doi.org/10.3390/md17020125

212. *Höller U., Wright A.D., Matthee G.F., Konig G.M., Draeger S., Aust H.-J., Schulz B.* // Mycological Research. 2000. V. 104. P. 1354–1365. https://doi.org/10.1017/S0953756200003117

213. *Yu G., Sun Z., Peng J., Zhu M., Che Q., Zhang G., Zhu T., Gu Q., Li D.* // Journal of Natural Products. 2019. V. 82. P. 2013–2017. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00345

214. *Kanoh K., Adachi K., Matsuda S., Shizuri Y., Yasumoto K., Kusumi T., Okumura K., Kirikae T.* // The Journal of Antibiotics. 2008. V. 61. P. 192–194. https://doi.org/10.1038/ja.2008.29

215. *Madhyastha M.S., Marquardt R.R., Masi A., Borsa J., Frohlich A.A.* // Journal of Food Protection. 1994. V. 57. P. 48–53. https://doi.org/10.4315/0362-028X-57.1.48

216. *Al-Fakih A.A., Almaqtri W.Q.A.* // Mycology. 2019. V. 10. P. 191–209. https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1604576

217. *Vansteelandt M., Blanchet E., Egorov M., Petit F., Toupet L., Bondon A., Monteau F., Le Bizec B., Thomas O.P., Pouchus Y.F., Le Bot R., Grovel O.* // Journal of Natural Products. 2013. V. 76. P. 297–301. https://doi.org/10.1021/np3007364

218. *Nguyen H.T., Yu N.H., Jeon S.J., Lee H.W., Bae C.-H., Yeo J.H., Lee H.B., Kim I.-S., Park H.W., Kim J.-C.* // Letters in Applied Microbiology. 2016. V. 62. P. 488–493. https://doi.org/10.1111/lam.12578

219. *Liu W.-H., Ding Y., Ji X., An F.-L., Lu Y.-H.* // The Journal of Antibiotics. 2019. V. 72. P. 111–113. https://doi.org/10.1038/s41429-018-0110-7

220. *Zhu G., Kong F., Wang Y., Fu P., Zhu W.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 71. https://doi.org/10.3390/md16020071

221. *Li M.-F., Li G.-H., Zhang K.-Q.* // Metabolites. 2019. V. 9. P. 58. https://doi.org/10.3390/metabo9030058

222. *Corral P., Esposito F.P., Tedesco P., Falco A., Tortorella E., Tartaglione L., Festa C., D'Auria M.V., Gnavi G., Varese G.C., Pascale D. de* // Marine Biotechnology. 2018. V. 20. P. 502–511. https://doi.org/10.1007/s10126-018-9821-9

223. *Trifonov L.S., Hilpert H., Floersheim P., Dreiding A.S., Rast D.M., Skrivanova R., Hoesch L.* // Tetrahedron. 1986. V. 42. P. 3157–3179. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)87382-8

224. *Fujii Y., Asahara M., Ichinoe M., Nakajima H.* // Phytochemistry. 2002. V. 60. P. 703–708. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00196-6

225. *Won-Gon K., Ryoo I.-J., Park S.-H., Kim D.-S., Lee S., Park K.-C., Yoo I.-D.* // Journal of Microbiology and Biotechnology. 2005. V. 15. P. 891–894.

226. *Asfour H.Z., Awan Z.A., Bagalagel A.A., Elfaky M.A., Abdelhameed R.F.A., Elhady S.S.* // Biomolecules. 2019. V. 9. P. 480. https://doi.org/10.3390/biom9090480

227. *Tan Q.-W., Fang P.-H., Ni J.-C., Gao F., Chen Q.-J.* // Molecules. 2017. V. 22. P. 2073. https://doi.org/10.3390/molecules22122073

228. *Pastre R., Marinho A.M.R., Rodrigues-Filho E., Souza A.Q.L., Pereira J.O.* // Química Nova. 2007. V. 30. P. 1867–1871. https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000800013

229. *Song T., Chen M., Ge Z.-W., Chai W., Li X.-C., Zhang Z., Lian X.-Y.* // The Journal of Organic Chemistry. 2018. V. 83. P. 13395–13401. https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b02172

230. *Rukachaisirikul V., Satpradit S., Klaiklay S., Phongpaichit S., Borwornwiriyapan K., Sakayaroj J.* // Tetrahedron. 2014. V. 70. P. 5148–5152. https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.05.105

231. *Ivanets E., Yurchenko A., Smetanina O., Rasin A., Zhuravleva O., Pivkin M., Popov R., Amsberg G. von, Afiyatullov S., Dyshlovoy S.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 232. https://doi.org/10.3390/md16070232

232. *Xu L.-L., Hai P., Zhang S.-B., Xiao J.-F., Gao Y., Ma B.-J., Fu H.-Y., Chen Y.-M., Yang X.-L.* // Journal of Natural Products. 2019. V. 82. P. 221–231. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00589

233. *Khalil Z.G., Huang X., Raju R., Piggott A.M., Capon R.J.* // The Journal of Organic Chemistry. 2014. V. 79. P. 8700–8705. https://doi.org/10.1021/jo501501z

234. *Yang S.-Q., Li X.-M., Li X., Chi L.-P., Wang B.-G.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 114. https://doi.org/10.3390/md16040114

235. *Lacey H.J., Vuong D., Pitt J.I., Lacey E., Piggott A.M.* // Australian Journal of Chemistry. 2016. V. 69. P. 152. https://doi.org/10.1071/CH15488

236. *Johnson J.H., Phillipson D.W., Kahle A.D.* // The Journal of Antibiotics. 1989. V. 42. P. 1184–1185. https://doi.org/10.7164/antibiotics.42.1184

237. *Limbadri S., Luo X., Lin X., Liao S., Wang J., Zhou X., Yang B., Liu Y.* // Molecules (Basel, Switzerland). 2018. V. 23. P. 2379. https://doi.org/10.3390/molecules23092379

238. *Takahashi C., Matsushita T., Doi M., Minoura K., Shingu T., Kumeda Y., Numata A.* // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1995. P. 2345–2353. https://doi.org/10.1039/P19950002345

239. *Rank C., Phipps R.K., Harris P., Frisvad J.C., Gotfredsen C.H., Larsen T.O.* // Tetrahedron Letters. 2006. V. 47. P. 6099–6102. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.06.086

240. *Afiyatullov S.Sh., Zhuravleva O.I., Antonov A.S., Berdyshev D.V., Pivkin M.V., Denisenko V.A., Popov R.S., Gerasimenko A.V., Amsberg G. von, Dyshlovoy S.A., Leshchenko E.V., Yurchenko A.N.* // The Journal of Antibi-

otics. 2018. V. 71. P. 846–853.
https://doi.org/10.1038/s41429-018-0072-9

241. *Zhou R., Liao X., Li H., Li J., Feng P., Zhao B., Xu S.* // Front. Chem. 2018. V. 6. P. 212.
https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00212

242. *Zheng C.-J., Bai M., Zhou X.-M., Huang G.-L., Shao T.-M., Luo Y.-P., Niu Z.-G., Niu Y.-Y., Chen G.-Y., Han C.-R.* // Journal of Natural Products. 2018. V. 81. P. 1045–1049.
https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00673

243. *Elsbaey M., Tanaka C., Miyamoto T.* // Phytochemistry Letters. 2019. V. 32. P. 70–76.
https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.04.023

244. *Chen Y., Liu Z., Huang Y., Liu L., He J., Wang L., Yuan J., She Z.* // Journal of Natural Products. 2019. V. 82. P. 1752–1758.
https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00918

245. *Wijeratne E.M.K., He H., Franzblau S.G., Hoffman A.M., Gunatilaka A.A.L.* // Journal of Natural Products. 2013. V. 76. P. 1860–1865.
https://doi.org/10.1021/np400391p

246. *Wang P., Cui Y., Cai C., Chen H., Dai Y., Chen P., Kong F., Yuan J., Song X., Mei W., Dai H.* // Marine Drugs. 2018. V. 17. P. 4.
https://doi.org/10.3390/md17010004

247. *Suzuki S., Hosoe T., Nozawa K., Kawai K., Yaguchi T., Udagawa S.* // Journal of Natural Products. 2000. V. 63. P. 768–772.
https://doi.org/10.1021/np990371x

248. *Bao J., Zhai H., Zhu K., Yu J.-H., Zhang Y., Wang Y., Jiang C.-S., Zhang X., Zhang Y., Zhang H.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 174.
https://doi.org/10.3390/md16050174

249. *Alfatafta A.A., Gloer J.B., Scott J.A., Malloch D.* // Journal of Natural Products. 1994. V. 57. P. 1696–1702.
https://doi.org/10.1021/np50114a012

250. *Jiao R.H., Xu S., Liu J.Y., Ge H.M., Ding H., Xu C., Zhu H.L., Tan R.X.* // Organic Letters. 2006. V. 8. P. 5709–5712.
https://doi.org/10.1021/ol062257t

251. *TePaske M.R., Gloer J.B., Wicklow D.T., Dowd P.F.* // Tetrahedron Letters. 1991. V. 32. P. 5687–5690.
https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)93530-5

252. *Ge H.M., Shen Y., Zhu C.H., Tan S.H., Ding H., Song Y.C., Tan R.X.* // Phytochemistry. 2008. V. 69. P. 571–576.
https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.014

253. *Banert K., Tantillo D.J.* // Natural Product Research. 2019. V. 33. P. 3011–3015.
https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1509330

254. *Tao H., Li Y., Lin X., Zhou X., Dong J., Liu Y., Yang B.* // Natural Product Communications. 2018. V. 13. P. 1629–1631.
https://doi.org/10.1177/1934578X1801301214

255. *Choi B.-K., Trinh P.T.H., Lee H.-S., Choi B.-W., Kang J.S., Ngoc N.T.D., Van T.T.T., Shin H.J.* // Marine Drugs. 2019. V. 17. P. 346.
https://doi.org/10.3390/md17060346

256. *Bladt T., Dürr C., Knudsen P., Kildgaard S., Frisvad J., Gotfredsen C., Seiffert M., Larsen T.* // Molecules. 2013. V. 18. P. 14629–14650.
https://doi.org/10.3390/molecules181214629

257. *Tan Y., Yang B., Lin X., Luo X., Pang X., Tang L., Liu Y., Li X., Zhou X.* // Journal of Natural Products. 2018. V. 81. P. 92–97.
https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00698

258. *Fang W., Lin X., Zhou X., Wan J., Lu X., Yang B., Ai W., Lin J., Zhang T., Tu Z., Liu Y.* // Med. Chem. Commun. 2014. V. 5. P. 701–705.
https://doi.org/10.1039/C3MD00371J

259. *Belofsky G., Jensen P., Renner M., Fenical W.* // Tetrahedron. 1998. V. 54. P. 1715–1724.
https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)10396-9

260. *Deng Q., Li G., Sun M., Yang X., Xu J.* // Natural Product Research. 2018. P. 1–5.
https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1512993

261. *Zhou J., Li G., Deng Q., Zheng D., Yang X., Xu J.* // Natural Product Research. 2018. V. 32. P. 2968–2972.
https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1395431

262. *Hamasaki T., Nagayama K., Hatsuda Y.* // Agricultural and Biological Chemistry. 1978. V. 42. P. 37–40.
https://doi.org/10.1080/00021369.1978.10862919

263. *Li X.-D., Li X.-M., Xu G.-M., Zhang P., Wang B.-G.* // Journal of Natural Products. 2015. V. 78. P. 844–849.
https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00004

264. *Wang P., Yu J.-H., Zhu K., Wang Y., Cheng Z.-Q., Jiang C.-S., Dai J.-G., Wu J., Zhang H.* // Fitoterapia. 2018. V. 127. P. 322–327.
https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.02.031

265. *Yao Q., Wang J., Zhang X., Nong X., Xu X., Qi S.* // Marine Drugs. 2014. V. 12. P. 5902–5915.
https://doi.org/10.3390/md12125902

266. *Qiu L., Wang P., Liao G., Zeng Y., Cai C., Kong F., Guo Z., Proksch P., Dai H., Mei W.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 108.
https://doi.org/10.3390/md16040108

267. *Xing C.-P., Xie C.-L., Xia J.-M., Liu Q.-M., Lin W.-X., Ye D.-Z., Liu G.-M., Yang X.-W.* // Marine Drugs. 2019. V. 17. P. 507.
https://doi.org/10.3390/md17090507

268. *Amagata T., Doi M., Tohgo M., Minoura K., Numata A.* // Chemical Communications. 1999. P. 1321–1322.
https://doi.org/10.1039/a903840j

269. *Amagata T., Tanaka M., Yamada T., Doi M., Minoura K., Ohishi H., Yamori T., Numata A.* // Journal of Natural Products. 2007. V. 70. P. 1731–1740.
https://doi.org/10.1021/np070165m

270. *Guo Y.-W., Gong B.-Q., Yuan J., Li H.-J., Mahmud T., Huang Y., Li J.-F., Yang D.-P., Lan W.-J.* // Journal of Natural Products. 2019. V. 83. P. 79–87.
https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00710

271. *Yang B., He Y., Lin S., Zhang J., Li H., Wang J., Hu Z., Zhang Y.* // Journal of Natural Products. 2019. V. 82. P. 1923–1929.
https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00305

272. *Evidente A., Sparapano L., Motta A., Giordano F., Fierro O., Frisullo S.* // Phytochemistry. 1996. V. 42. P. 1541–1546.
https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00206-3

273. *Yan T., Guo Z., Jiang R., Wei W., Wang T., Guo Y., Song Y., Jiao R., Tan R., Ge H.* // Planta Medica. 2013. V. 79. P. 348–352. https://doi.org/10.1055/s-0032-1328260

274. *Lallemand B., Masi M., Maddau L., De Lorenzi M., Dam R., Cimmino A., Moreno y Banuls L., Andolfi A., Kiss R., Mathieu V., Evidente A.* // Phytochemistry Letters. 2012. V. 5. P. 770–775. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2012.08.011

275. *Li Y., Ye D., Shao Z., Cui C., Che Y.* // Marine Drugs. 2012. V. 10. P. 497–508. https://doi.org/10.3390/md10020497

276. *Yu H.-B., Wang X.-L., Zhang Y.-X., Xu W.-H., Zhang J.-P., Zhou X.-Y., Lu X.-L., Liu X.-Y., Jiao B.-H.* // Journal of Natural Products. 2018. V. 81. P. 1553–1560. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00039

277. *Lu X.-L., Liu J.-T., Liu X.-Y., Gao Y., Zhang J., Jiao B.-H., Zheng H.* // The Journal of Antibiotics. 2014. V. 67. P. 171–174. https://doi.org/10.1038/ja.2013.104

278. *Li X.-D., Li X., Li X.-M., Xu G.-M., Liu Y., Wang B.-G.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 440. https://doi.org/10.3390/md16110440

279. *Ratnaweera P.B., Williams D.E., Silva E.D. de, Wijesundera R.L.C., Dalisay D.S., Andersen R.J.* // Mycology. 2014. V. 5. P. 23–28. https://doi.org/10.1080/21501203.2014.892905

280. *Yang M.-H., Li T.-X., Wang Y., Liu R.-H., Luo J., Kong L.-Y.* // Fitoterapia. 2017. V. 116. P. 72–76. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.11.008

281. *Amagata T., Amagata A., Tenney K., Valeriote F.A., Lobkovsky E., Clardy J., Crews P.* // Organic Letters. 2003. V. 5. P. 4393–4396. https://doi.org/10.1021/ol0356800

282. *Kong F.-D., Huang X.-L., Ma Q.-Y., Xie Q.-Y., Wang P., Chen P.-W., Zhou L.-M., Yuan J.-Z., Dai H.-F., Luo D.-Q., Zhao Y.-X.* // Journal of Natural Products. 2018. V. 81. P. 1869–1876. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00382

283. *Springer J.P., Dorner J.W., Cole R.J., Cox R.H.* // The Journal of Organic Chemistry. 1979. V. 44. P. 4852–4854. https://doi.org/10.1021/jo00394a023

284. *Li H.-L., Li X.-M., Li X., Yang S.-Q., Wang B.-G.* // Phytochemistry Letters. 2019. V. 32. P. 138–142. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.05.017

285. *Li G.-Y., Li B.-G., Yang T., Yin J.-H., Qi H.-Y., Liu G.-Y., Zhang G.-L.* // Journal of Natural Products. 2005. V. 68. P. 1243–1246. https://doi.org/10.1021/np0501738

286. *Fukuda T., Kurihara Y., Kanamoto A., Tomoda H.* // The Journal of Antibiotics. 2014. V. 67. P. 593–595. https://doi.org/10.1038/ja.2014.46

287. *Hamed A., Abdel-Razek A.S., Omran D.A., El-Metwally M.M., El-Hosari D.G., Frese M., Soliman H.S.M., Sewald N., Shaaban M.* // Natural Product Research. 2019. P. 1–10. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1544977

288. *Shaaban M., El-Metwally M.M., Abdel-Razek A.A., Laatsch H.* // Natural Product Research. 2018. V. 32. P. 2437–2446. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1419230

289. *Hamed A., Abdel-Razek A., Frese M., Stammler H., El-Haddad A., Ibrahim T., Sewald N., Shaaban M.* // Molecules. 2018. V. 23. P. 299. https://doi.org/10.3390/molecules23020299

290. *Fan S.-Q., Xie C.-L., Xia J.-M., Xing C.-P., Luo Z.-H., Shao Z., Yan X.-J., He S., Yang X.-W.* // Organic & Biomolecular Chemistry. 2019. V. 17. P. 5925–5928. https://doi.org/10.1039/C9OB01159E

291. *Li W.-H., Chang S.-T., Chang S.-C., Chang H.-T.* // Natural Product Research. 2008. V. 22. P. 1085–1093. https://doi.org/10.1080/14786410802267510

292. *Rosenberger M., Neukom C.* // The Journal of Organic Chemistry. 1982. V. 47. P. 1782–1785. https://doi.org/10.1021/jo00348a043

293. *Gao H., Hong K., Chen G.-D., Wang C.-X., Tang J.-S., Yu Y., Jiang M.-M., Li M.-M., Wang N.-L., Yao X.-S.* // Magnetic Resonance in Chemistry. 2009. V. 48. P. 38–43. https://doi.org/10.1002/mrc.2536

294. *Talapatra S.K., Bhaumik A., Talapatra B.* // Phytochemistry. 1992. V. 31. P. 2431–2434. https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83293-8

295. *Tong Z.-B., Cui X.-H., Wang J., Zhang C.-L., Zhang Y.-Y., Ren Z.-J.* // Natural Product Research. 2017. V. 31. P. 2564–2567. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1320785

296. *Chen S., Snyder J.K.* // The Journal of Organic Chemistry. 1989. V. 54. P. 3679–3689. https://doi.org/10.1021/jo00276a033

297. *Gao S.-S., Li X.-M., Li C.-S., Proksch P., Wang B.-G.* // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2011. V. 21. P. 2894–2897. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.03.076

298. *Igarashi Y., Sekine A., Fukazawa H., Uehara Y., Yamaguchi K., Endo Y., Okuda T., Furumai T., Oki T.* // The Journal of Antibiotics. 2002. V. 55. P. 371–376. https://doi.org/10.7164/antibiotics.55.371

299. *Xie C.-L., Zhang D., Xia J.-M., Hu C.-C., Lin T., Lin Y.-K., Wang G.-H., Tian W.-J., Li Z.-P., Zhang X.-K., Yang X.-W., Chen H.-F.* // Marine Drugs. 2019. V. 17. P. 178. https://doi.org/10.3390/md17030178

300. *Abdel-Razek A.S., Hamed A., Frese M., Sewald N., Shaaban M.* // Steroids. 2018. V. 138. P. 21–25. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.06.005

301. *Kaleem S., Ge H., Yi W., Zhang Z., Wu B.* // Natural Product Research. 2019. P. 1–9. https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1680669

302. *Bayman P., Baker J.L., Doster M.A., Michailides T.J., Mahoney N.E.* // Applied and Environmental Microbiology. 2002. V. 68. P. 2326–2329. https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2326-2329.2002

303. *Wang Y., Wang L., Liu F., Wang Q., Selvaraj J., Xing F., Zhao Y., Liu Y.* // Toxins. 2016. V. 8. P. 83. https://doi.org/10.3390/toxins8030083

304. *Sargent M.V., Stransky P.O.* // Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1. 1982. P. 1605. https://doi.org/10.1039/p19820001605

305. *Wang J., Lu Z., Liu P., Wang Y., Li J., Hong K., Zhu W.* // Planta Medica. 2012. V. 78. P. 1861–1866. https://doi.org/10.1055/s-0032-1315395

306. *Budde K., Quella F., Mathes A., Melchior W., Müller H., Nuyken O., Spiegel S.* // Angewandte Makromolekulare Chemie. 1992. V. 194. P. 103–117. https://doi.org/10.1002/apmc.1992.051940109

307. *Zhao Y., Liu D., Proksch P., Zhou D., Lin W.* // Phytochemistry. 2018. V. 155. P. 61–68. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.07.017

308. *Liu Y., Ding L., Fang F., He S.* // Natural Product Research. 2019. V. 33. P. 2466–2470. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1452012

309. *Li T.-X., Yang M.-H., Wang X.-B., Wang Y., Kong L.-Y.* // Journal of Natural Products. 2015. V. 78. P. 2511–2520. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00008

310. *Ding L., Xu P., Li T., Liao X., He S., Xu S.* // Natural Product Research. 2019. V. 33. P. 3404–3408. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1480622

311. *Cai J., Zhou X.-M., Yang X., Tang M.-M., Liao Q.-Y., Meng B.-Z., Liao S., Chen G.-Y.* // Bioorganic Chemistry. 2019. P. 103362. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103362

312. *Bai M., Huang G.-L., Mei R.-Q., Wang B., Luo Y.-P., Nong X.-H., Chen G.-Y., Zheng C.-J.* // Marine Drugs. 2019. V. 17. P. 433. https://doi.org/10.3390/md17080433

313. *Zhou X.-M., Zheng C.-J., Song X.-M., Tang M.-M., Yang J.-Y., Yang X., Peng S.-J., Cai J., Chen G.-Y.* // Fitoterapia. 2019. V. 139. P. 104400. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104400

314. *Wu J.-T., Zheng C.-J., Zhang B., Zhou X.-M., Zhou Q., Chen G.-Y., Zeng Z.-E., Xie J.-L., Han C.-R., Lyu J.-X.* // Natural Product Research. 2019. V. 33. P. 34–40. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1431634

315. *Kongyen W., Rukachaisirikul V., Phongpaichit S., Sakayaroj J.* // Natural Product Research. 2015. V. 29. P. 1995–1999. https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1022542

316. *Rao K.V., Sadhukhan A.K., Veerender M., Ravikumar V., Mohan E.V.S., Dhanvantri S.D., Sitaramkumar M., Moses Babu J., Vyas K., Om Reddy G.* // Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 2000. V. 48. P. 559–562. https://doi.org/10.1248/cpb.48.559

317. *Sun W., Luan S., Qi C., Tong Q., Yan S., Li H., Zhang Y.* // Cell Communication and Signaling. 2019. V. 17. P. 111. https://doi.org/10.1186/s12964-019-0425-4

318. *Zeng Q., Zhong W.-M., Chen Y.-C., Xiang Y., Chen X.-Y., Tian X.-P., Zhang W.-M., Zhang S., Wang F.-Z.* // Natural Product Research. 2019. P. 1–8. https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1569658

319. *Sun Y., Liu J., Li L., Gong C., Wang S., Yang F., Hua H., Lin H.* // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2018. V. 28. P. 315–318. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.12.049

320. *Parvatkar R.R., D'Souza C., Tripathi A., Naik C.G.* // Phytochemistry. 2009. V. 70. P. 128–132. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.10.017

321. *Zhu J.X., Ding L., He S.* // Natural Product Research. 2019. V. 33. P. 1191–1195. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1465423

322. *Ding L., Li T., Liao X., He S., Xu S.* // The Journal of Antibiotics. 2018. V. 71. P. 902–904. https://doi.org/10.1038/s41429-018-0079-2

323. *Blair L.M., Sperry J.* // Journal of Natural Products. 2013. V. 76. P. 794–812. https://doi.org/10.1021/np400124n

324. *Wermuth C.G.* // MedChemComm. 2011. V. 2. P. 935–941. https://doi.org/10.1039/C1MD00074H

325. *Zhang Y.-X., Yu H.-B., Xu W.-H., Hu B., Guild A., Zhang J.-P., Lu X.-L., Liu X.-Y., Jiao B.-H.* // Journal of Natural Products. 2019. V. 82. P. 3089–3095. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00700

326. *Hayashi H., Mukaihara M., Murao S., Arai M., Lee A.Y., Clardy J.* // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 1994. V. 58. P. 334–338. https://doi.org/10.1271/bbb.58.334

327. *Cheng Z., Xu W., Liu L., Li S., Yuan W., Luo Z., Zhang J., Cheng Y., Li Q.* // Marine Drugs. 2018. V. 16. P. 358. https://doi.org/10.3390/md16100358

328. *Giromini C., Rebucci R., Fusi E., Rossi L., Saccone F., Baldi A.* // Cell Biology and Toxicology. 2016. V. 32. P. 249–258. https://doi.org/10.1007/s10565-016-9332-2

329. *Rottkord U., Röhl C., Ferse I., Schulz M.-C., Rückschloss U., Gekle M., Schwerdt G., Humpf H.-U.* // Archives of Toxicology. 2017. V. 91. P. 1461–1471. https://doi.org/10.1007/s00204-016-1799-3

330. *Cramer B., Harrer H., Nakamura K., Uemura D., Humpf H.-U.* // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2010. V. 18. P. 343–347. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.10.050

331. *Brown E.D., Wright G.D.* // Nature. 2016. V. 529. P. 336–343. https://doi.org/10.1038/nature17042

332. *Lewis K.* // Nature. 2012. V. 485. P. 439–440. https://doi.org/10.1038/485439a

333. *Lewis K.* // Nature Reviews Drug Discovery. 2013. V. 12. P. 371–387. https://doi.org/10.1038/nrd3975

334. *Cameron A.J., Davison E.K., An C., Stubbing L.A., Dunbar P.R., Harris P.W.R., Brimble M.A.* // The Journal of Organic Chemistry. 2020. V. 85. P. 1401–1406. https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b02348

335. *Lai Y., Zhang N., Zhang Y., Chen J.-H., Yang Z.* // Organic Letters. 2018. V. 20. P. 4298–4301. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b01733

336. *Wolfender J.-L., Litaudon M., Touboul D., Queiroz E.F.* // Natural Product Reports. 2019. V. 36. P. 855–868. https://doi.org/10.1039/C9NP00004F

Antibiotics from Extremophilic Micromycetes

A. A. Baranova*, V. A. Alferova*, *, V. A. Korshun*, **, ***, and A. P. Tyurin*, ***, #**

#Phone: +7 (499) 246-69-83; e-mail: anton2rin@gmail.com

**Gause Institute of New Antibiotics, ul. Bolshaya Pirogovskaya 11/1, Moscow, 119021 Russia*

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

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

Extremophilic microorganisms, i.e. capable of functioning normally at extremely high or low temperatures, pressure and other environmental conditions, have been in the focus of microbiologists' attention for several decades due to the biotechnological potential of their enzymes. The latter (also called extremozymes) have found applications in the production of food, detergents and other industries. At the same time, the inhabitants of extreme econiches for a long time remained practically unexplored from the natural products chemistry point of view. In recent years, the emergence of new antibiotic-resistant strains of pathogens that affect humans and animals has become a global problem. The problem is compounded by a strong slowdown in the development of new antibiotics. In search of new active substances and scaffolds for medical chemistry, researchers turn to unexplored natural sources: recently there has been a sharp increase in the number of studies on secondary metabolites produced by extremophiles. From the moment penicillin was discovered to the present day, micromycetes, along with actinobacteria, are one of the most productive sources of antibiotic compounds used in medicine and agriculture. Many authors consider extremophilic micromycetes as a promising source of small molecules with an unusual mechanism of action or significant structural novelty. This review summarizes the latest (for 2018–2019) experimental data on antibiotic compounds produced by extremophilic micromycetes with various types of adaptation. Active metabolites are classified by structure type and biosynthetic origin. The data on the biological activity of the isolated metabolites are summarized.

Keywords: antibiotics, *extremophiles*, *micromycetes*, *extreme habitats*, *resistance*, *biotechnology*

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 666–669

УДК 57.021,615.28,615.099.092

ПЕПТИД HLDF-6-АМИД СНИЖАЕТ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ДОКСОРУБИЦИНА И АКТИВИРУЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ ИНФУЗОРИЙ *Tetrahymena pyriformis*

© 2020 г. О. Ю. Соколов*, #, А. Н. Позднякова*, Е. Г. Черемных*, Е. В. Васильева*, Н. В. Кост*, Ю. А. Золотарев****

**ФГБНУ Научный центр психического здоровья РАН, Россия, 115552 Москва, Каширское шоссе, 34*

***Институт молекулярной генетики РАН, Россия, 119334 Москва, пл. Курчатова, 4*

****ФГБНУ Институт фармакологии им. В.В. Закусова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Балтийская, 9*

Поступила в редакцию 09.04.2020 г.
После доработки 16.04.2020 г.
Принята к публикации 29.04.2020 г.

Механизмы ряда биологических эффектов пептидного нейропротектора HLDF-6-амида до сих пор неизвестны и требуют дополнительного изучения. Нами впервые установлено, что HLDF-6-амид дозозависимо (1–100 мкМ) стимулирует пролиферацию инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, причем антагонист глутаматных NMDA-рецепторов МК801 частично блокирует данный эффект. Показано, что введение пептида (12.5–100 мкМ) дозозависимо снижает цитотоксический и цитостатический эффект доксорубицина (25 мкМ) на инфузориях. Радио-лигандный анализ выявил наличие мест специфического связывания [^{3}H] Ac-HLDF-6-амида на клеточных мембранах коры головного мозга крыс, что свидетельствует о рецепторном механизме действия пептида. Таким образом, впервые показано, что HLDF-6-амид стимулирует пролиферацию и обладает цитопротекторными свойствами, что может лежать в основе его ранозаживляющего, ноотропного и нейропротекторного действия. Установлено участие глутаматной системы, в частности ионотропных NMDA-рецепторов, в реализации его эффектов.

Ключевые слова: пептид HLDF-6-амид, доксорубицин, МК 801, инфузории Tetrahymena pyriformis

DOI: 10.31857/S0132342320060329

ВВЕДЕНИЕ

Гексапептид Thr-Gly-Glu-Asn-His-Arg, фрагмент 41–46 фактора дифференцировки лейкоцитов (HLDF), полностью воспроизводит действие полноразмерного фактора, обладает широким спектром ноотропной и нейропротективной активности. На основе модификаций молекулы HLDF-6 разрабатываются пептидные препараты для профилактики и лечения цереброваскулярных и нейродегенеративных заболеваний [1–3]. Недавно были выявлены другие лечебные эффекты одного из них, пептида HLDF-6-амида. Так в эксперименте на животных было показано, что HLDF-6-амид в составе геля ускоряет эпителизацию раневой поверхности ожога, причем в минимальной концентрации [4].

Целью исследования была проверка гипотезы о том, что в основе указанных биологических эффектов пептида может лежать его пролиферативная активность. В работе использовались инфузории рода *Tetrahymena*, широко применяющиеся в фармакологии на первом этапе оценки безопасности и/или эффективности различных соединений. Преимуществом инфузорий перед другими тест-организмами является высокая интенсивность обмена веществ, быстрый рост, возможность работы со стерильной культурой и стандартным штаммом [5]. Изучали влияние HLDF-6-амида на рост культуры в присутствии цитостатика доксорубицина и в норме. Молекулярный механизм обнаруженных эффектов пептида изучали с точки зрения его взаимодействия с глутаматными рецепторами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Была изучена способность HLDF-6-амида влиять на рост числа инфузорий в суточной культуре. Было установлено, что введение пептида в культуру клеток дозозависимо стимулировало их раз-

Сокращения: HLDF-фактор дифференцировки лейкоцитов; HLDF-6 – пептидный фрагмент $_{41}$TGENHR$_{46}$ фактора HLDF; HLDF-6-амид – амидная форма пептида HLDF-6.

Автор для связи: (тел.: +7 (903) 535-95-26; эл. почта: oleg-sokolov@yandex.ru).

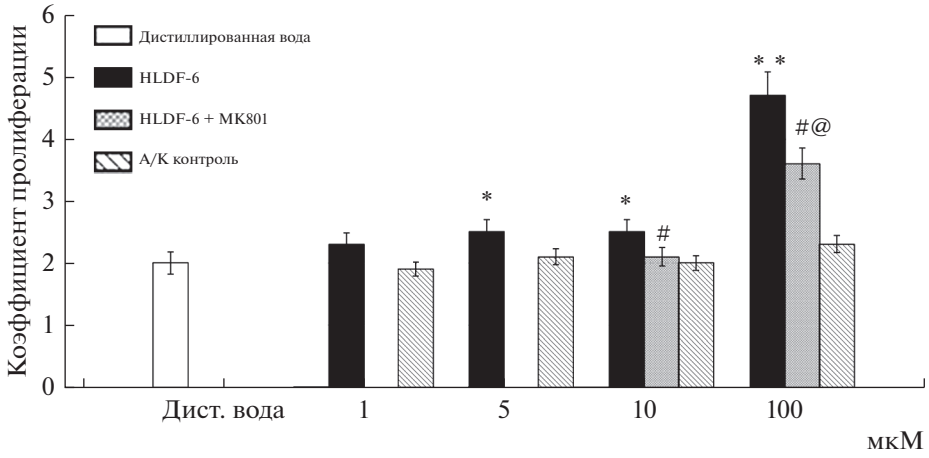


Рис. 1. Пролиферативный эффект пептида HLDF-6-амида. Данные трех независимых экспериментов представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего ($m \pm$ SEM). *, ** – Пролиферативный эффект HLDF-6-амида, отличие от дистиллированной воды и аминокислотного контроля, $p < 0.05$, $p < 0.01$. # – Ингибирующий эффект МК 801, отличие от HLDF-6-амида, $p < 0.05$. @ – Отличие от дистиллированной воды и аминокислотного контроля, $p < 0.05$.

множение (рис. 1). Пептид оказывал статистически значимый ($p < 0.05$) пролиферативый эффект уже в концентрации 5 мкМ. Наибольший эффект ($p < 0.01$) логично наблюдался при его максимальной концентрации 100 мкМ. Эквимолярный аминокислотный контроль во всех использованных концентрациях (1–100 мкМ) данным эффектом не обладал и показывал значения, сходные с показателем, наблюдаемым при культивировании клеток в дистиллированной воде. Таким образом, можно сделать вывод о специфическом действии молекулы пептида, а не простом "подкормочном" эффекте. Обнаруженный нами пролиферативный эффект пептида хорошо согласуется с данными о влиянии нативного HLDF-6 на синтез белка в культуре гепатоцитов [6].

Предполагается, что функциональной мишенью специфического фармакологического эффекта пептида HLDF-6-амида являются глутаматные NMDA-рецепторы [3]. Мы исследовали возможность участия глутаматной системы в обнаруженной пролиферативной активности пептида на инфузориях. Было показано, что введение в культуру селективного антагониста NMDA-рецепторов MK801 в концентрации 10 мкМ значимо снижало ($p < 0.05$) пролиферативный эффект 100 мкМ пептида, а в концентрации 1 мкМ MK801 полностью блокировал ($p < 0.05$) эффект 10 мкМ HLDF-6-амида (рис. 1). Полученные результаты хорошо согласуются с данными об увеличении плотности именно NMDA-рецепторов в гиппокампе мозга мышей Balb/c при хроническом интраназальном введении HLDF-6-амида [3].

Ранее было показано, что нативный HLDF-6 снижает цитотоксическое действие фактора некроза опухоли на клетках линии HL-60 [7]. С другой стороны, он обладает выраженным цитотоксическим действием на клетки лимфолейкоза P-388 и стимулирует цитотоксическую активность фагоцитов в отношении этих клеток [8]. Мы исследовали способность HLDF-6-амида снижать токсическое действие синтетического цитостатика доксорубицина (25 мкМ) в культуре инфузорий при 24, 96 и 120 часовой инкубации. Было установлено, что пептид во всем диапазоне использованных концентраций (12.5–100 мкМ) и во всех трех временных точках достоверно ($p < 0.05$) снижал эффект цитостатика при совместном введении. Показатели клеточного роста были значительно выше, чем в пробах, содержащих только доксорубицин (рис. 2). Эффект пептида был дозозависимым. Наиболее ярко он проявлялся на 96 и 120 часовой культуре. Известно, что действие доксорубицина на клетку связано как с индукцией оксидативного стресса (острый цитотоксический эффект), так и с ингибированием ДНК-топоизомеразы (хронический цитостатический эффект). Адаптация инфузорий к острому оксидативному стрессу обычно наступает в первые часы инкубации, далее все определяет их способность противостоять мутагенному действию цитостатика. Мы показали, что HLDF-6-амид значительно увеличивает адаптационные возможности инфузорий. Это свойство пептида открывает широкие перспективы его использования в комплексной, с цитостатиками, химиотерапии опухолей для снижения их побочных токсических эффектов на здоровые клетки организма.

Чтобы подтвердить возможность рецепторных механизмов в эффектах HLDF-6-амида, было проведено пилотное радио-рецепторное исследование с использованием меченного тритием ацетиламидного производного пептида [^{3}H] Ac-HLDF-6-амида. Оно подтвердило наличие мест специфического связывания пептида на клеточных мембранах

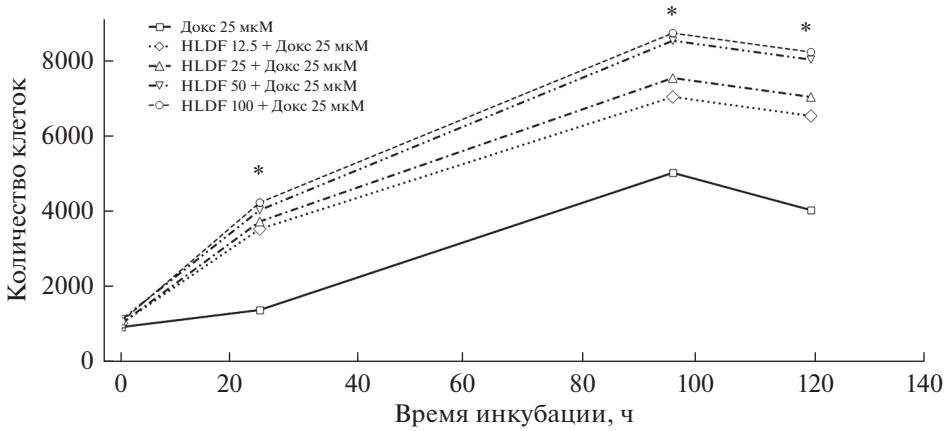


Рис. 2. Влияние совместного введения HLDF-6-амида и доксорубицина на пролиферацию инфузорий. * – Антитоксический эффект HLDF-6-амида, отличие от доксорубицина, $p < 0.05$.

коры головного мозга крыс. Анализ вытеснения показал сходную аффинность ацетиламидной и амидной форм пептида (IC50 0.75 и 0.53 мкМ соответственно), в то время как сродство нативного HLDF-6 к предполагаемым рецепторам было вдвое и втрое ниже (IC50 1.83 мкМ). Следует признать, что для окончательных выводов необходима дальнейшая характеристика сайтов рецепторного связывания с помощью селективных лигандов. Однако уже сейчас можно говорить о существовании рецепторных механизмов в биологических эффектах HLDF-6-амида.

Впервые на клетках эукариот *Tetrahymena pyriformis* было показано, что HLDF-6-амид стимулирует пролиферацию и обладает цитопротекторными свойствами, что может лежать в основе его ранозаживляющего, ноотропного и нейропротективного действия. Установлено участие NMDA-глутаматной системы, в частности ионотропных NMDA-рецепторов, в реализации его эффектов. Показана возможность получения эффективной оценки действия различных препаратов на живую клетку с помощью инфузорий.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали: доксорубицин, МК 801, аминокислоты (Sigma). Пептиды HLDF-6, HLDF-6-NH_2, Ac-HLDF-6-NH_2, [^{3}H] Ac-HLDF-6-NH_2 были получены в ИМГ РАН, как описано ранее [10].

Автоматизированный биотест на инфузориях

Инфузории *Tetrahymena pyriformis* были получены из собственной коллекции штаммов ФГБНУ НЦПЗ. Измерения проводили на автоматическом анализаторе БиоЛаТ (ГОСТ 31674-2012). Оценивали общее количество подвижных клеток в пробах и его изменение под действием различных концентраций исследуемых веществ: HLDF-6-амид (1–100 мкМ), МК801 (1, 10 мкМ), доксорубицин (25 мкМ). В качестве контроля использовали дистиллированную воду и эквимолярную смесь аминокислот, входящих в состав HLDF-6.

Радио-рецепторный анализ

Инкубационная смесь 0.5 мл, 50 мМ Tris-HCl, pH 7.1, содержала 50 мкл 10 нМ [^{3}H] Ac-HLDF-6-NH_2 (22 Кюри/ммоль), 200 мкл суспензии мембран коры головного мозга крыс, 50 мкл немеченых производных HLDF-6 в разных концентрациях (1 нМ–1 мМ). Неспецифическое связывание определяли в присутствии 20 μМ немеченого Ac-HLDF-6-NH_2. Специфическое связывание составило 75–80%.

Статистическая обработка данных

Использовали программу Statistica 6.0. Стандартные отклонения и статистическую значимость отличий вычисляли по *t*-критерию Стьюдента. Все измерения проводились в триплетах. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего ($m \pm$ SEM).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Костанян И.А., Жохов С.С., Сторожева З.И., Прошин А.Т., Сурина Е.А., Бабиченко И.И.,*

Шерстнев В.В., Липкин В.М. // Биоорган. химия. 2006. Т. 32. С. 399–407. [*Kostanian I.A., Zhokhov S.S., Storozheva Z.I., Proshin A.T., Surina E.A., Babichenko I.I., Sherstnev V.V., Lipkin V.M.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2006. V. 32. P. 360–367.] https://doi.org/10.1134/S1068162006040066

2. *Костанян И.А., Сторожева З.И., Семенова Н.А., Липкин В.М.* // Докл. акад. наук. 2009. Т. 428, С. 565–569. [*Kostanyan I.A., Storozheva Z.I., Semenova N.A., Lipkin V.M.* // Dokl. Biol. Sci. 2009. V. 428. P. 418–422.] https://doi.org/10.1134/s0012496609050081

3. *Zolotarev Y.A., Kovalev G.I., Kost N.V., Voevodina M.E., Sokolov O.Y., Dadayan A.K., Kondrakhin E.A., Vasileva E.V., Bogachuk A.P., Azev V.N., Lipkin V.M., Myasoedov N.F.* // J. Psychopharmacol. 2016. V. 30 P. 922–935. https://doi.org/10.1177/0269881116660705

4. *Зиновьев Е.В., Цыган В.Н., Арцимович И.В., Асадулаев М.С., Панеях М.Б., Зубов В.В., Лукьянов С.А., Костяков Д.В., Жилин А.А., Лопатин И.М., Уманская А.А., Османов К.Ф., Кравцов С.Н., Апчел А.В., Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Дадаян К.А.* // Вестник российской военно-медицинской академии. 2018. Т. 63. С. 148–153.

5. *Gromovykh T.I., Demchenko A.G., Cheremnykh E.G., Feldman N.B., Lyundup A.V., Balyasin M.V., Kiselyova O.I., Gromovykh P.S., Lutsenko S.V.* // Int. J. Nanotec. 2019. V. 16. P. 87–99. https://doi.org/10.1504/IJNT.2019.102395

6. *Бродский В.Я., Золотарев Ю.А., Мальченко Л.А., Андреева Л.А., Лазарев Д.С., Буторина Н.Н., Козик В.С., Мясоедов Н.Ф.* // Онтогенез. 2019. Т. 50. С. 340–346. https://doi.org/10.1134/S0475145019050033

7. *Гибанова Н.В., Ракитина Т.В., Липкин В.М., Костанян И.А.* // Биохимия. 2007. Т. 72. С. 49–60. https://doi.org/10.1134/s0006297907010063

8. *Даниленко Е.Д., Сысоева Г.М., Устименко С.Ю., Самуков В.В., Костанян И.А., Масычева В.И.* // Вопр. онкологии. 2009. Т. 55. № 6. С. 757–760.

9. *Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Кост Н.В., Воеводина М.Э., Соколов О.Ю., Козик В.С., Шрам С.И., Азев В.Н., Бочаров Э.В., Богачук А.П., Липкин В.М., Мясоедов Н.Ф.* // Биоорган. химия. 2015. Т. 41. С. 644–656. [*Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Kost N.V., Voevodina M.E., Sokolov O.Y., Kozik V. S., Shram S.I., Bocharov E.V., Bogachuk A.P., Azev V.N., Lipkin V.M., Myasoedov N.F.* // Russ. J. Bioorg. Chem., 2015. V. 41. P. 578–589.] https://doi.org/10.1134/S1068162015060205

HLDF-6-Amide Reduces the Cytotoxicity of Doxorubicin and Activates the Proliferation of *Tetrahymena pyriformis*

O. Yu. Sokolov*,#, A. N. Pozdnyakova*, E. G. Cheremnykh*, E. V. Vasileva*, N. V. Kost*, and Y. A. Zolotarev****

#Phone: +7 (903) 535-95-26; e-mail: oleg-sokolov@yandex.ru

**Mental Health Research Center of RAS, Kashirskoe sh. 34, Moscow, 115552 Russia*

***Institute of Molecular Genetics of RAS, pl. Kurchatova 2, Moscow, 119334 Russia*

****Zakusov Institute of Pharmacology, ul. Baltiyskaya 8, Moscow, 119334 Russia*

The mechanisms of a number of biological effects of the peptide neuroprotector HLDF-6-amide are still unknown and require further study. It was found that HLDF-6-amide dose-dependent (1–100 μM) stimulates the proliferation of *Tetrahymena pyriformis* infusoria, and the MK801 glutamate NMDA receptor antagonist partially blocks this effect. The introduction of a peptide (12.5–100 μM) reduces the cytotoxic and cytostatic effect of doxorubicin (25 microns) on infusoria. Radio-ligand analysis revealed the presence of specific binding sites of [^{3}H]Ac-HLDF-6-amide on the cell membranes of the rat brain cortex, which indicates the receptor mechanism of action of the peptide. Thus, it was shown for the first time that HLDF-6-amide stimulates proliferation and has cytoprotective properties, which may underlie its wound-healing, nootropic and neuroprotective effects. The participation of the glutamate system, in particular ionotropic NMDA receptors, in these effects was established.

Keywords: peptide HLDF-6-amide, doxorubicin, MK 801, Tetrahymena pyriformis infusoria

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 670–675

УДК 517.354

ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА LKEKK НА КЕРАТИНОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. Е. В. Наволоцкая*,#, В. Б. Садовников*, Д. В. Зинченко*, Ю. А. Золотарев, В. М. Липкин***, А. Н. Мурашев***

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

***ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН, Россия, 123182 Москва, пл. Акад. Курчатова, 2*

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

Поступила в редакцию 10.04.2020 г.
После доработки 24.04.2020 г.
Принята к публикации 29.04.2020 г.

Синтезирован пептид LKEKK (Np5), соответствующий последовательности 16–20 тимозина-α_1 (TM-α_1) и последовательности 131–135 интерферона-α_2 (IFN-α_2), получили [^{3}H]Np5 и установили, что он с высоким сродством и специфичностью связывается с кератиноцитами человека (K_d 2.6 нМ). В диапазоне концентраций 50–1000 нМ Np5 дозозависимо снижал индуцированную интерлейкином-17A (IL-17A) продукцию кератиноцитами провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-6, IL-1α) и увеличивал продукцию ими противовоспалительного цитокина IL-10 *in vitro*. Показано, что действие пептида опосредовано активацией растворимой гуанилатциклазы.

Ключевые слова: белки, пептиды, рецепторы, цитокины, кератиноциты, воспаление, кожа

DOI: 10.31857/S0132342320060226

ВВЕДЕНИЕ

Кожа, самый большой по площади орган человека и животных, выполняет защитную функцию, участвует в дыхании, терморегуляции, обменных и многих других жизненно важных процессах. Кожа млекопитающих состоит из двух слоев: эпидермиса, который образует защитный барьер на поверхности тела, и дермы, которая представляет собой соединительную ткань, содержащую петли капилляров, нервные окончания, волосяные фолликулы, железы и мышечные волокна, придающие коже прочность и эластичность. Эпидермис представляет собой многослойный плоский эпителий, состоящий из пролиферирующих базальных и дифференцированных супрабазальных кератиноцитов, которые являются основными клетками эпидермиса [1]. Кератиноциты реагируют на различные факторы внешней среды и непосредственно участвуют в регуляции воспалительного ответа кожи. Показано, что пять провоспалительных цитокинов, продуцируемых кератиноцитами, участвуют в индукции воспаления кожи: IL-17A, IL-22, онкостатин M, TNF-α и IL-1α [2]. Установлена роль отдельных цитокинов в развитии воспалительных процессов кожи: IL-22 и онкостатин M контролируют эпидермальную гиперплазию и потерю дифференцировки, тогда как IL-1α, IL-17A и TNF-α обеспечивают активацию врожденного иммунитета [3].

Несколько лет назад мы синтезировали пептид LKEKK (Np5), соответствующий последовательностям 16–20 тимозина-α_1 (TM-α_1) и 131–135 интерферона-α_2 (IFN-α_2), и показали его способность специфически связываться с Т- и В-лимфоцитами человека [4, 5], мембранами эпителиальных клеток тонкого кишечника крысы [6, 7], эпителиальными клетками линий IEC-6 крысы [8, 9] и Caco-2 человека [9], клетками линии Raw 264.7 мыши [10]. Во всех случаях обработка протеазами не влияла на связывание, что указывало на небелковую природу рецептора пептида; связывание конкурентно ингибировали TM-α_1, IFN-α_2 и В субъединица холерного токсина. Мы предположили, что рецептором Np5 может быть рецептор токсина GM1-ганглиозид [11, 12].

Недавно показано, что Np5 способен подавлять развитие воспаления в эпителиальных клетках кишечника *in vitro* и *in vivo*: в клетках линии Caco-2

Сокращения: CT-B – B-субъединица холерного токсина; cGMP – циклический гуанозин-3',5'-монофосфат; DSS – декстран сульфат натрия; IFN – интерферон; iNOS – индуцибельная NO-синтаза; LPS –липополисахарид; ODQ – (1H-[1,2,4]оксадиазол[4,3-α]хиноксалин-1-он; pGC – мембраносвязанная гуанилатциклаза; sGC – растворимая гуанилатциклаза; TM-α_1 – тимозин-α_1.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (496) 773-66-68; факс: +7 (496) 733-05-27; эл. почта: navolotskaya@bibch.ru).

Таблица 1. Основные характеристики синтезированных пептидов

Пептид	Чистота, %	Данные аминокислотного анализа	Молекулярная масса, Да	
			экспериментальное значение	расчетное значение
Np5	>98	Glu 1.08 (1), Leu 1.00 (1), Lys 3.32 (3)	645.2	644.87
iNp5	>97	Glu 1.14 (1), Leu 1.05 (1), Lys 3.30 (3)	648.65	644.87

человека пептид значительно снижал TNF-α-индуцированную экспрессию IL-6, IL-8, IL-1β и, в то же время, увеличивал экспрессию IL-10, а также уменьшал выраженность воспаления у мышей с экспериментальным колитом [13].

Цель данного исследования – охарактеризовать противовоспалительное действие Np5 на кератиноциты человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные характеристики пептидов (чистота, данные аминокислотного анализа, молекулярная масса) приведены в табл. 1.

Удельная активность [^{3}H]Np5 составила 28 Ки/ммоль.

Эксперименты показали, что в выбранных нами условиях [^{3}H]Np5 специфически связывается с кератиноцитами человека, связывание было обратимым и насыщаемым, динамическое равновесие в системе меченый пептид–рецептор устанавливалось примерно через 30 мин и сохранялось, по крайней мере, 1 ч. Поэтому для определения K_d, реакцию связывания проводили в течение 30 мин. Неспецифическое связывание меченого пептида в этих условиях составляло 12.6 ± 0.3% от величины его общего связывания. На рис. 1 приведен график Скэтчарда, характеризующий специфическое связывание [^{3}H]Np5 с кератиноцитами. Линейность графика свидетельствует о наличии на клетках одного типа рецепторов к CT-B, а значение K_d = 2.6 ± 0.2 нМ – о высоком сродстве пептида к рецептору.

Для характеристики специфичности связывания [^{3}H]Np5 с клетками, в качестве потенциальных конкурентов меченого пептида были протестированы немеченые TM-α_1, IFN-α_2, Np5 и iNp5. Приведенные в табл. 2 значения K_i свидетельствуют о высокой ингибирующей способности TM-α_1, IFN-α_2 и Np5 и отсутствии таковой у пептида с инвертированной последовательностью iNp5. Неспособность iNp5 ингибировать связывание указывает на высокую специфичность рецептора. Таким образом, TM-α_1, IFN-α_2 и Np5 связываются с высоким сродством и специфичностью с общим рецептором на кератиноцитах человека.

Скрининг активности 36 цитокинов позволил идентифицировать пять мощных индукторов воспаления – IL-17A, IL-22, онкостатин M, TNF-α и IL-1α, при этом IL-1α, IL-17A и TNF-α проявляли наибольшую активность [2]. Год назад мы продемонстрировали противовоспалительную активность Np5 на моделях TNF-индуцированного воспаления человеческих клеток кишечника линии Caco-2 *in vitro* и DSS-индуцированного колита у мышей *in vivo* [13]. Здесь мы исследовали противовоспалительную активность Np5, используя *in vitro* модель IL-17A-индуцированного воспаления кератиноцитов человека. Для этого клетки обрабатывали пептидом (10–1000 нМ) и IL-17A (20 нг/мл) добавляли для индукции воспаления. Параллельно в качестве отрицательного контроля был протестирован пептид с инвертированной последовательностью iNp5. Эксперименты показали, что обработка кератиноцитов пептидом Np5 в диапазоне концентраций 50–1000 нМ дозозависимо снижала IL-17A-индуцируемую продукцию трех провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-6 и IL-1α) (табл. 3) и, в то же время, увеличивала выработку противовоспалительного цитокина IL-10 (табл. 4). Пептид с инвертированной последовательностью был неактивен, что указывало на высокую специфичность действия Np5.

Ранее мы установили, что действие Np5 на различные клетки (человеческие T- и B-лимфоциты, человеческие Caco-2 и крысиные IEC-6 эпители-

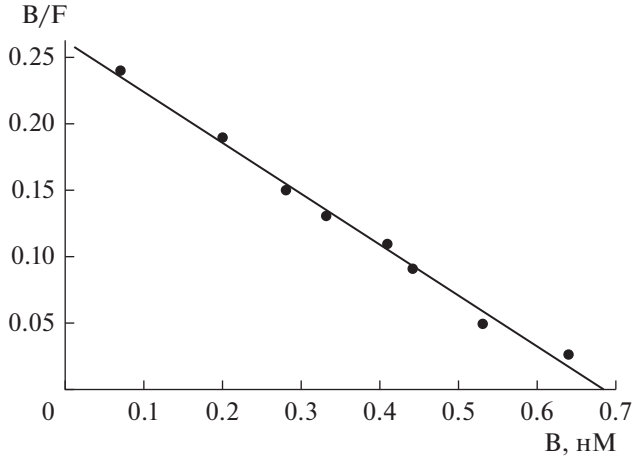


Рис. 1. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания [^{3}H]Np5 с кератиноцитами человека. B и F – молярные концентрации связанного и свободного меченого пептида соответственно.

Таблица 2. Ингибирование немечеными лигандами специфического связывания [^{3}H]Np5 с кератиноцитами человека

Лиганд	IC_{50}	K_i
	нМ ± SEM	
IFN-α_2	7.2 ± 0.4	2.5 ± 0.2
TM-α_1	7.6 ± 0.4	2.6 ± 0.3
Np5	8.3 ± 0.3	2.9 ± 0.2
iNp5	>100	>100

альные клетки кишечника, мышиные Raw 264.7 макрофагоподобные клетки) реализуется cGMP-зависимым путем передачи сигнала [4, 5, 8]. Результаты настоящей работы, представленные в табл. 5, показывают, что Np5 при концентрациях 50–1000 нМ дозозависимо увеличивает активность sGC в кератиноцитах, но не влияет на активность pGC; протестированный параллельно iNp5 был неактивен. Таким образом, связывание Np5 с кератиноцитами человека приводит к увеличению активности в них sGC. Мы также исследовали действие пептида на способность кератиноцитов к IL-17A-индуцированной продукции TNF-α и IL-1α при частичной или полной потери активности sGC. Для ингибирования активности фермента был использован ODQ, специфический ингибитор sGC [14]. Данные, представленные в табл. 6, показывают, что ODQ дозозависимо снижал активность sGC и ингибирующий эффект 500 нМ Np5 на IL-17A-индуцированную продукцию кератиноцитами TNF-α и IL-1α. Таким образом, снижение активности фермента сопровождалось потерей Np5 способности ингибировать секрецию противовоспалительных цитокинов, и следовательно действие пептида опосредовано через sGC.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пептид Np5 (LKEKK) связывается с высокой специфичностью и аффинностью с кератиноцитами человека, снижает их способность к IL-17A-индуцированной продукции провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-6 и IL-1α) и, в то же время, увеличивает выработку противовоспалительного цитокина IL-10. Таким образом, Np5, короткий пептид с простой структурой, обладает значительным противовоспалительным потенциалом и пригоден для разработки на его основе лекарственного препарата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали TM-a_1, IL-17A, TNF-α, IL-1α (“Immundiagnostik AG”, Германия), фенилметилсульфонилфторид (PMSF), Tris (“Fluka”, США), апротинин, лейпептин, пепстатин А, фетальную сыворотку теленка и Hepes (“ICN”, США); сахарозу, БСА, ЭДТА, ЭГТА, азид натрия (NaN_3) (“Serva”, Германия), среду для культивирования клеток EpiGro (“Cell Applications, Inc.”, США), все остальные реагенты и растворители были отечественного производства и использовались после соответствующей очистки.

Пептиды Np5 (LKEKK) и iNp5 (KKEKL) синтезировали на автоматических синтезаторах (модель 430A и Vega Coupler, модель C250; “Applied Biosystems”, США) с использованием Boc/Bzl-тактики наращивания пептидной цепи и очищали препаративной обращеннофазовой хроматографией (хроматограф “Gilson”, Франция), колонка Waters SymmetryPrep C18 (19 × 300 мм) (“Malva”, Греция). Синтезированные пептиды были охарактеризованы данными аналитической обращеннофазовой ВЭЖХ (хроматограф “Gilson”, Франция; колонка XTerra RP18, “Malva”, Греция), аминокислотного анализа (гидролиз 6 М HCl, 24 ч, 110°C; аминокислотный анализатор 4151 Alpha Plus, “LKB”, Швеция) и масс-спектрально-

Таблица 3. Влияние Np5 и iNp5 на IL-17A-индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов кератиноцитами человека

Концентрация пептида (нМ)	Цитокин (пг/мг белка ± SEM)					
	TNF-α		IL-6		IL-1α	
	Np5	iNp5	Np5	iNp5	Np5	iNp5
– (Контроль)	28.3 ± 2.3		15.5 ± 1.7		27.4 ± 2.2	
10	29.6 ± 2.5	28.8 ± 2.7	15.9 ± 1.2	15.5 ± 1.6	28.0 ± 2.9	27.1 ± 2.5
50	23.4 ± 2.8*	27.5 ± 3.3	11.6 ± 1.4*	15.9 ± 1.4	24.7 ± 2.6	27.5 ± 2.7
100	19.6 ± 2.5*	28.2 ± 2.9	9.7 ± 1.3*	15.2 ± 1.5	20.7 ± 2.5*	27.7 ± 2.9
500	15.3 ± 2.4*	27.8 ± 2.5	8.5 ± 1.4*	16.0 ± 1.8	17.5 ± 2.4*	27.4 ± 2.8
1000	15.9 ± 2.7*	29.2 ± 2.6	8.8 ± 1.6*	15.7 ± 1.6	18.1 ± 2.9*	27.2 ± 2.3

* Достоверное отличие от контроля ($P < 0.05$).

Таблица 4. Влияние Np5 и iNp5 на IL-17A-индуцированную продукцию противовоспалительного цитокина IL-10 кератиноцитами человека

Концентрация пептида (нМ)	IL-10 (пг/мг белка ± SEM)	
	Np5	iNp5
– (Контроль)	33.4 ± 3.2	
10	30.9 ± 3.6	34.0 ± 3.7
50	26.2 ± 3.4*	33.2 ± 3.5
100	23.3 ± 3.3*	32.9 ± 3.3
500	20.5 ± 3.7*	33.7 ± 3.2
1000	21.1 ± 3.0*	33.5 ± 3.4

* Достоверное отличие от контроля ($P < 0.05$).

го анализа (масс-спектрометр "Finnigan", США). Рекомбинантный интерферон-α_2 был получен из ФГУП "Гос, НИИ ОЧБ" ФМБА (Санкт-Петербург, Россия).

Нормальные эпидермальные кератиноциты человека (NHEK, "Cell Applications, Inc.", США) культивировали в течение 24 ч в не содержащей сыворотку среде EpiGro, содержащей 10% эмбриональную сыворотку теленка, при 37°C в атмосфере 5% CO_2. Клетки (10^6/лунка) высевали в 6-луночные планшеты для культивирования клеток ("Nunc", Дания). Жизнеспособность клеток оценивали по окрашиванию трипановым синим (выживаемость клеток: 95%). Клетки преинкубировали с Np5 или iNp5 (10–1000 нМ) в течение 1 ч до стимуляции IL-17A (20 нг/мл) [15].

[^{3}H]Np5 получали реакцией высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО) [16]. К раствору 2.0 мг пептида в 0.5 мл воды добавляли 50 мг окиси алюминия и упаривали на роторном испарителе. Окись алюминия с нанесенным пептидом смешивали с 10 мг катализатора (5% Rh/Al_2O_3). Полученную твердую смесь помещали в ампулу объемом 10 мл. Ампулу вакуумировали, заполняли газообразным тритием до давления 250 мм рт. ст., нагревали до 170°C и выдерживали при этой температуре в течение 20 мин. Затем ампулу охлаждали, вакуумировали, продували водородом и повторно вакуумировали. Меченый пептид экстрагировали из твердой реакционной смеси двумя порциями по 3 мл 50% водного этанола, полученный раствор объединяли и упаривали. Для удаления лабильного трития процедуру повторяли дважды. Очистку меченого пептида проводили методом ВЭЖХ со спектрофотометром "Beckman" при длинах волн 254 и 280 нм на колонке Kromasil (4 × 150 мм, зернение 5 мкм) при 20°C, элюент – 0.1% ТХУ, градиент метанола 42–70% за 20 мин, скорость потока 3 мл/мин. Включение трития в пептид рассчитывали с использованием жидкостного сцинтилляционного счета.

Реакцию связывания [^{3}H]Np5 с кератиноцитами проводили в соответствии со следующей схемой: клеточную суспензию (10^6 клеток/мл) инкубировали с меченым пептидом (10^{-11}–10^{-7} М, три параллельных пробы для каждой концентрации) в 1 мл среды EpiGro, содержавшей 10 мМ Hepes, 20 мМ NaN_3 и 50 мкМ PMSF, pH 7.4, при 4°C в течение 30 мин. По окончании инкубации реакционную смесь фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/A ("Whatman", Англия). Фильтры промывали ледяным физиологическим раствором, содержащим 10 мМ Hepes, pH 7.4 (три раза по 5 мл). Радиоактивность на фильтрах подсчитывали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика LS 5801 ("Beckman", США). Величину специфического связывания [^{3}H]Np5 с клетками определяли по разности между его общим и неспецифическим связыванием, а величину неспецифического связывания [^{3}H]Np5 – в присутствии 10^{-4} М немеченого пептида (1000-кратный избыток по отношению к самой большой концентрации меченого пептида – 10^{-7} М). Для определения равновесной константы диссоциации K_d строили график зависимости отношения

Таблица 5. Влияние Np5 и iNp5 на активность sGC и pGC в кератиноцитах человека

Пептид (нМ)	Гуанилатциклазная активность (нмоль cGMP/мг белка за 10 мин ± SEM)			
	sGC		pGC	
	Np5	iNp5	Np5	iNp5
Контроль	1.6 ± 0.2		2.2 ± 0.2	
10	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.2	2.3 ± 0.3	2.0 ± 0.3
50	2.1 ± 0.2*	1.7 ± 0.2	2.4 ± 0.3	2.2 ± 0.3
100	2.4 ± 0.2*	1.6 ± 0.3	2.1 ± 0.2	2.0 ± 0.4
500	2.9 ± 0.3*	1.5 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.3 ± 0.2
1000	2.8 ± 0.3*	1.8 ± 0.3	2.4 ± 0.2	2.0 ± 0.4

* Достоверное отличие от контроля ($P < 0.05$).

Таблица 6. Влияние ODQ на активность sGC и IL-17A-индуцированный уровень цитокинов в кератиноцитах человека, преинкубированных с 500 нМ Np5

ODQ (мкМ)	Гуанилатциклазная активность (нмоль cGMP/мг белка за 10 мин ± SEM)	Цитокин (пг/мг белка ± SEM)	
		TNF-α	IL-1α
Контроль	2.8 ± 0.2	15.9 ± 2.7	18.0 ± 2.4
5	2.2 ± 0.3*	18.2 ± 2.5*	20.2 ± 2.6
10	1.3 ± 0.3*	20.3 ± 2.2*	24.2 ± 2.3*
50	<0.1*	29.2 ± 2.7*	26.6 ± 2.9*
100	<0.1*	28.5 ± 2.4*	27.0 ± 2.5*

* Достоверное отличие от контроля ($P < 0.05$).

молярных концентраций связанного (B) и свободного (F) меченого пептида от молярной концентрации связанного меченого пептида (B) [17].

Для оценки способности TM-α_1, IFN-α_2, пептидов Np5 и iNp5 ингибировать специфическое связывание [^{3}H]Np5 с кератиноцитами, клетки (10^6/мл) инкубировали с меченым пептидом (5 нМ) и одним из потенциальных конкурентов (диапазон концентраций 10^{-10}–10^{-5} М, три повтора для каждой концентрации), как описано выше. Константу ингибирования (K_i) определяли по формуле: $K_i = [IC]_{50}/(1 + [L]/K_d)$ [18], где [L] – молярная концентрация [^{3}H]Np5; K_d – равновесная константа диссоциации комплекса [^{3}H]Np5–рецептор; $[IC]_{50}$ – концентрация немеченого лиганда, вызывающая 50%-ное ингибирование специфического связывания меченого пептида, Величину $[IC]_{50}$ определяли графически на основании кривой ингибирования. Значение K_d измеряли предварительно, как описано выше.

Для определения активности растворимой (sGC) и мембраносвязанной (pGC) гуанилатциклазы в кератиноцитах, их ресуспендировали в 10 мМ Tris-HCl-буферном растворе, pH 7.5, содержащем 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ дитиотреитол, 5 мкМ пепстатин А, 50 мкМ PMSF, 10 мкМ ингибитор трипсина из сои и 1 мМ бензамидин. Полученную суспензию (2.5×10^8 клеток/мл) гомогенизировали в ледяной бане и гомогенат центрифугировали при 100000 *g*, (10 мин, 4°C). Супернатанты отбирали, а осадки ресуспендировали в равных объемах буферного раствора. Супернатанты и ресуспендированные осадки использовали для определения активности sGC и pGC соответственно. Гуанилатциклазную активность определяли путем мониторинга превращения α-[^{32}P]GTP в [^{32}P]cGMP и выражали в нмоль cGMP, образовавшегося за 10 мин в расчете на 1 мг белка [19], продукт выделяли преципитацией с карбонатом цинка и хроматографией на колонке с окисью алюминия [20]. Концентрацию белка определяли с помощью метода Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин [21]. Для ингибирования активности sGC использовали ингибитор фермента ODQ (1H-[1,2,4]оксадиазол[4,3-α]хиноксалин-1-он) в диапазоне концентраций 5–100 мкМ [14]. Для оценки достоверности различий между средними значениями в контроле и опыте использовали *t*-критерий Стьюдента.

Для определения продукции кератиноцитами цитокинов клетки гомогенизировали в тройном объеме ледяного натрий-фосфатного буферного раствора (PBS, pH 7.4), содержащего 1 мМ PMSF, апротинин, лейпептин, пепстатин А (10 мкг/мл каждого, и центрифугировали при 12000 *g* (10 мин, 4°C). Концентрацию белка определяли по Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин [21]. Иммуноферментный анализ проводили с помощью ELISA Kits (BD Biosciences, San Jose, CA) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" (грант № III-12, руководитель – чл.-корр. РАН В.М. Липкин).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Все международные этические стандарты при работе с животными были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Breitkreutz D., Mirancea N., Nischt R.* // Histochem. Cell. Biol. 2009. V. 132. P. 1–10. https://doi.org/10.1007/s00418-009-0586
2. *Guilloteau K., Paris I., Pedretti N., Boniface K., Juchaux F., Huguier V., Guillet G., Bernard F.-X., Lecron J.-C.,*

Morel F. // J. Immunol. 2010. V. 184. P. 5263–5270. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902464

3. *Robeony H., Petit-Paris I., Garnier J., Barrault C., Pedretti N., Guilloteau K., Jegou J.-F., Guillet G., Huguier V., Lecron J.-C., Bernard F.-X., Morel F.* // PLoS One. 2014. V. 9. e101937. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101937
4. *Наволоцкая Е.В., Зинченко Д.В., Золотарев Ю.А., Колобов А.А., Липкин В.М.* // Биохимия. 2016. Т. 81. С. 1109–1114. [*Navolotskaya E.V., Zinchenko D.V., Zolotarev Y.A., Kolobov A.A., Lipkin V.M.* // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. P. 871–875.] https://doi.org/10.1134/S0006297916080071
5. *Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Lipkin V.M., Zav'yalov V.P.* // Int. Immunopharmacol. 2017. V. 50. P. 279–282. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.07.011
6. *Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Владимиров В.И., Золотарев Ю.А., Колобов А.А.* // Биоорган. химия. 2016. Т. 42. С. 533–538. [*Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Vladimirov V.I., Zolotarev Y.A., Kolobov A.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2016. V. 42. P. 479–483.] https://doi.org/10.1134/S1068162016050137
7. *Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Владимиров В.И., Золотарев Ю.А* // Биоорган. химия. 2017. Т. 43. С. 655–660. [*Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Vladimirov V.I., Zolotarev Y.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 673–677.] https://doi.org/10.1134/S1068162017060115
8. *Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Владимиров В.И., Золотарев Ю.А., Липкин В.М.* // Биоорган. химия. 2018. Т. 44. С. 401–406. [*Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Vladimirov V.I., Zolotarev Y.A., Lipkin, V.M.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 403–407.] https://doi.org/10.1134/S1068162018030123
9. *Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Lipkin V.M., Zav'yalov V.P.* // Toxicology in Vitro. 2018. V. 47. P. 269–273. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.12.010
10. *Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Владимиров В.И., Золотарев Ю.А., Липкин В.М., Мурашев А.Н.* // Биоорган. химия. 2019. Т. 45. С. 288–294. [*Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Vladimirov V.I., Zolotarev Y.A., Lipkin V.M., Murashev A.N.* // Rus. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 122–128.] https://doi.org/10.1134/S1068162019020092
11. *Cuatrecasas P.* // Biochemistry. 1973. V. 12. P. 3558–3566.
12. *Holmgren J., Lönnroth I., Svennerholm L.* // Infect. Immun. 1973. V. 8. P. 208–214.
13. *Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Lipkin V.M., Zav'yalov V.P.* // J. Clin. Exp. Immunol. 2019. V. 4. P. 1–6. https://doi.org/10.33140/JCEI.04.04.03
14. *Feelisch M.1., Kotsonis P., Siebe J., Clement B., Schmidt H.H.* // Mol. Pharmacol. 1999. V. 56. P. 243–253. https://doi.org/10.1124/mol.56.2.243
15. *Chorachoo J., Lambert S., Furnholm T., Roberts L., Reingold L., Auepemkiate S., Voravuthikunchai S.P., Johnston A.* // PLoS One. 2018. V. 13. P. e0205340. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205340
16. *Zolotarev Y.A., Dadayan A.K., Bocharov E.V., Borisov Y.A., Vaskovsky B.V., Dorokhova E.M., Myasoedov N.F.* // Amino Acids. 2003. V. 24. P. 325–333. https://doi.org/10.1007/s00726-002-0404-7
17. *Pennock B.E.* // Anal. Biochem. 1973. V. 56. P. 306–309.
18. *Cheng Y.C., Prusoff W.* // Biochem. Pharmacol. 1973. V. 22. P. 3099–3108.
19. *Schultz G., Buhme E.* Methods of Enzymatic Analysis. Weinheim, Germany: Verlag Chemie, 1984. P. 379–389.
20. *Southam E.* // Curr. Protoc. Toxicol. 2001. V. 10. P. 10.5. https://doi.org/10.1002/0471140856.tx1005s04
21. *Lowry O.H., Rosebbrough N.J., Farr O.L., Randal R.J.* // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.

Effect of Peptide LKEKK on Human Keratinocytes

E. V. Navolotskaya*,#, V. B. Sadovnikov*, D. V. Zinchenko*, Y. A. Zolotarev, V. M. Lipkin***, and A. N. Murashev***

#Phone: +7 (496) 773-66-68; fax: +7 (496) 733-05-27; e-mail: navolotskaya@bibch.ru

**Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, pr. Nauki 6, Moscow region, Pushchino, 142290 Russia*

***Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Science, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia*

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

Synthesized the peptide LKEKK (Np5) corresponding to the sequence 16–20 of thymosin-α_1 (TM-α_1) and to the sequence 131–135 of interferon-α_2 (IFN-α_2), prepared [^{3}H]Np5 and found that it binds with high affinity and specificity to human keratinocytes. In the concentration range of 50–1000 nM Np5 increased in a dose-dependent manner the soluble guanylate cyclase activity in keratinocytes, significantly reduced IL-17A-induced secretion of pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6, and IL-1α) and increased the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by the cells *in vitro*. It was shown that the action of the peptide is mediated through a soluble guanylate cyclase-dependent signaling pathway.

Keywords: protein, *peptide*, *receptor*, *cytokine*, *keratinocyte*, *inflammation*, *skin*

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 676–685

УДК 577.112.083:577.15

РАЗРАБОТКА ПИЛОТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ ЧЕЛОВЕКА В РАСТВОРИМОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ФОРМАХ

© 2020 г. Д. А. Макаров*, #, А. А. Зинченко*, В. Н. Степаненко*, Д. С. Калинин*, **, Т. Д. Мелихова*, Е. А. Нокель*, М. Э. Гаспарян*, И. В. Мягких*, Д. А. Долгих*, **

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

***ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1*

Поступила в редакцию 27.02.2020 г.
После доработки 17.03.2020 г.
Принята к публикации 22.03.2020 г.

Энтеропептидаза, протеолитический фермент EC 3.4.21.9, представляет собой гликопротеин, состоящий из двух тяжелых и легких полипептидных цепей. Легкая цепь фермента представляет собой сериновую протеиназу, рекомбинантные варианты которой применяются в биотехнологии для расщепления пептидных связей в гибридных белках после специфического сайта узнавания DDDDK- или DDDDR-. Мы разработали пилотный способ получения рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы человека, содержащей каскад из двух аффинных меток. Сконструированный экспрессионный плазмидный вектор pL-HEP-H6-CBD, кодирующий гибридный белок, содержащий последовательность легкой цепи энтеропептидазы человека, металлсвязывающий и хитин-связывающий домены был транформирован в штамм *Escherichia coli* BL21(DE3) и после экспрессии гибридного белка HEP-H6-CBD была разработана относительно простая схема ренатурации и очистки фермента. После иммобилизации очищенного препарата на хитиновый носитель фермент сохранял активность специфического расщепления субстратов в течении как минимум 6 циклов.

Ключевые слова: рекомбинантный белок, энтеропептидаза, иммобилизованный фермент

DOI: 10.31857/S0132342320050140

ВВЕДЕНИЕ

Простота выделения, очистки и идентификации многих рекомбинантных белков часто достигается путем создания гибридных конструкций, включающих дополнительные аффинные пептидные метки [1]. Удаление аффинной метки может быть осуществлено ферментативным расщеплением гибридного белка, однако в промышленности использование подобного подхода часто ограничивается высокой стоимостью ферментных препаратов. В связи с этим, создание удобных в работе гибридных конструкций рекомбинантных ферментов с приемлемой активностью, пригодных для использования в промышленных процессах получения белковых препаратов различного назначения, а также разработка недорогих технологичных процессов выделения и очистки таких ферментных препаратов является актуальной задачей. В число наиболее широко используемых в биотехнологии рекомбинантных протеолитических ферментов входит легкая цепь энтеропептидазы человека [2].

Энтеропептидаза (EC 3.4.21.9) является высокоспецифичной протеиназой и играет ключевую роль в пищеварении позвоночных [3]. В начале каскада активации ферментов пищеварения энтеропептидаза с высокой эффективностью катализирует гидролиз трипсиногена строго по остатку лизина в специфическом сайте узнавания -DDDDK–I-, высвобождая трипсин, который далее активирует целый ряд панкреатических зимогенов [4, 5].

Список сокращений: мГБ-1 – модельный гибридный белок-1 (Trx-интерферон альфа-2b); мГБ-2 – модельный гибридный белок-2 (Trx-пуротоксин-6); L-HEP – легкая цепь энтеропептидазы человека; t-L-HEP – легкая цепь энтеропептидазы человека L-HEP – H6 – CBD, содержащая каскад из двух аффинных меток; i-t-L-HEP – иммобилизованный вариант легкой цепи энтеропептидазы человека L-HEP – H6 – CBD, содержащей каскад из двух аффинных меток; CBD – хитин-связывающий домен, H6 – полигистидиновый домен; ГБ – гибридный белок; ТВ – тельца включения; STI – ингибитор трипсина сои.

Автор для связи: (тел.: +7 (985) 699-77-47; эл. почта: youngchemist@mail.ru).

Нативная энтеропептидаза представляет собой дисульфид-связанный гетеродимер, состоящий из “тяжелой” и “легкой” цепей с молекулярной массой ~120 и ~26 кДа соответственно [3]. Легкая цепь энтеропептидазы, каталитический домен фермента, является сериновой эндопептидазой трипсинового типа [6] и содержит четыре дисульфидных мостика, которые важны для функционирования и стабильности молекулы фермента [7].

Описано несколько способов получения энтеропептидазы из природных источников [8, 9]. Однако в биотехнологических целях чаще используют рекомбинантную легкую цепь энтеропептидазы [10, 11].

В исследовании Ла-Валли показана возможность клонирования и функциональной экспрессии легкой цепи бычьей энтеропептидазы в клетках млекопитающих COS-1 [12]. Легкая цепь энтеропептидазы была успешно экспрессирована в разнообразных биологических системах, таких как *Aspergillus niger* [13] и *Saccharomyces cerevisiae* [14]. Также были опубликованы многочисленные работы по экспрессии легкой цепи энтеропептидазы в *Pichia pastoris* [15]. Кроме того, легкая цепь энтеропептидазы может быть получена даже в клетках насекомых [16].

Наиболее предпочтительной системой для экспрессии легкой цепи энтеропептидазы является бактерия *E. coli*, поскольку получаемый белок продуцируется в большом количестве за короткий срок. Однако исследователи сталкивались с тем, что энтеропептидаза продуцировалась в нерастворимой форме. До сегодняшнего дня было опубликовано несколько исследований, посвященных повышению растворимости и изучению фолдинга рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы [17–20].

В настоящей работе описана оригинальная, эффективная, легко масштабируемая технология получения рекомбинантного гибридного белка t-L-HEP содержащего хитин-связывающий домен на *C*-конце, что позволило иммобилизовать фермент на хитиновый сорбент и использовать многократно для расщепления слитных белков медицинского назначения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка пилотной технологии получения рекомбинантного белка L-HEP

В лаборатории инженерии белка ИБХ РАН под руководством академика М.П. Кирпичникова ранее была разработана методика получения рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы человека (регистрационный номер GenBank U09860) [11, 17] и создан штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pET-32a/L-HEP гибридного белка Trx-DDDDK-L-HEP, содержащего аминокислотную последовательность тиоредоксина (Trx), специфического сайта узнавания энтеропептидазы (DDDDK-) и легкой цепи энтеропептидазы человека (L-HEP) (рис. 1).

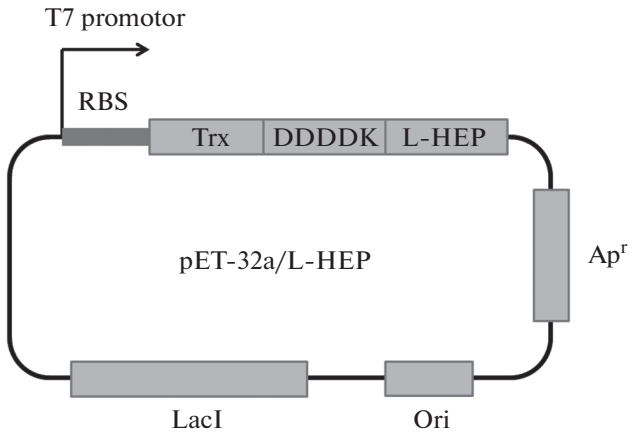


Рис. 1. Физическая карта плазмиды pET-32a/L-HEP. ori – ориджин репликации, AmpR – ген резистентности к ампициллину, lacI – ген репрессора лактозного оперона, T7 promoter – промотор бактериофага T7, RBS – сайт связывания с рибосомой, Trx-DDDDK-L-HEP – ген, кодирующий гибридный белок, состоящий из тиоредоксина, сайта узнавания легкой цепи энтеропептидазы человека и непосредственно легкой цепи энтеропептидазы человека.

Особенность данной конструкции заключалась в том, что ГБ после ренатурации автокаталитически расщеплялся с высвобождением свободной L-HEP и белка-партнера.

Лабораторная методика позволяла получить 10 мг высокоочищенной активной L-HEP с 1 л клеточной культуры после двух циклов ренатурации [11, 17]. Для наработки рекомбинантной L-HEP в количествах, достаточных для производственных целей, требовалось масштабировать и оптимизировать процесс получения фермента. Наличие в лабораторной методике нескольких стадий диализа и использование дорогостоящего аффинного сорбента (STI-агароза) осложняло масштабирование процесса. Поэтому была проведена оптимизация технологии получения L-HEP.

Переход от культивирования штамма-продуцента в качалочных колбах на промышленный ферментер объемом 200 л увеличил средний выход влажной биомассы до 40 г с 1 л культуральной среды. Экспрессия гибридного белка при этом достигала 30% от общего белка клетки.

Тельца включения, полученные после разрушения биомассы, отмывали буферными растворами, содержащими мочевину и/или тритон X-100, как описано в Экспериментальной части. Отмытые ТВ растворяли в денатурирующих условиях, используя буферный раствор 50 мМ Трис,

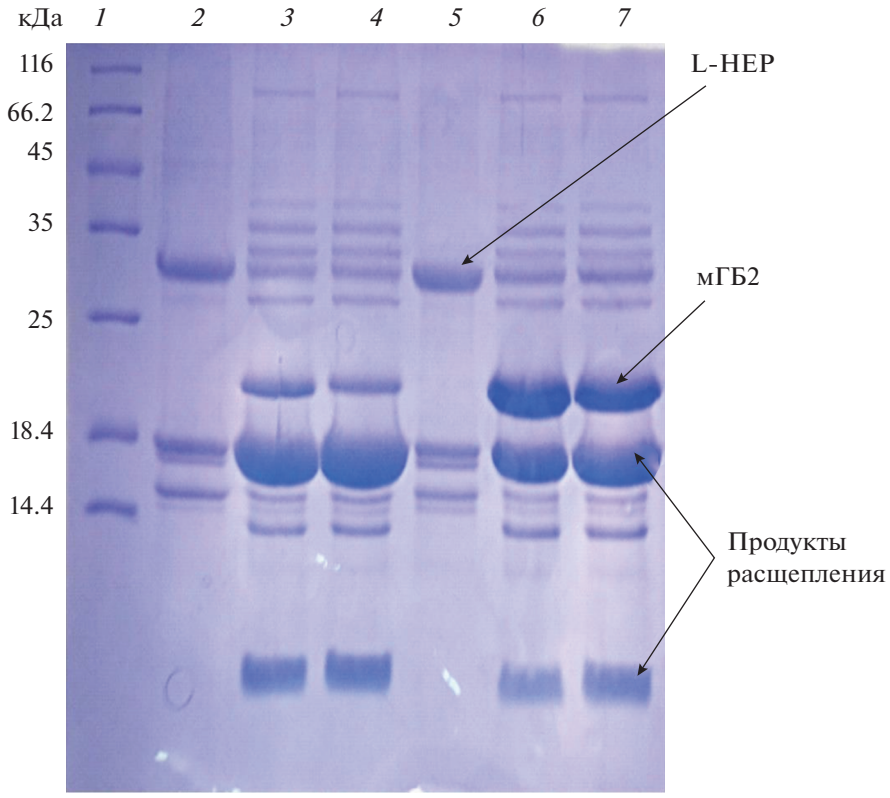


Рис. 2. Электрофореграмма расщепления модельного гибридного белка 2 с помощью L-НЕР: *1* – стандарт молекулярных масс, *2* – ренатурат легкой цепи энтеропептидазы человека с добавкой 20% глицерина, *3–4* – расщепление мГБ-2, 25°C в течение 8 и 16 ч соответственно, в массовом соотношении 1 : 50, *5* – ренатурат легкой цепи энтеропептидазы человека с добавкой 1 мМ цистеина, *6–7* – расщепление мГБ-2, 25°C в течение 8 и 16 ч соответственно, в массовом соотношении 1 : 50.

6 М мочевина, pH 10. Ренатурацию осуществляли методом разбавления растворенных ТВ до постоянной концентрации гибидного белка 0.7 мг/мл в соответствующих буферных растворах.

Оптимизация стадии ренатурации включала исследование влияния ряда факторов на эффективность процесса. В процессе исследований варьировали состав и pH буферных растворов, температуру проведения процесса, время реакции, а также изучали влияние на ход ренатурации различных химических реагентов (NaCl, ЭДТА, аргинина, глицерина, цистеина, сорбитола и др.).

Наиболее удачными для ренатурации ГБ оказались буферные растворы, в состав которых входили 20% глицерин или 1 мМ цистеин. Остальные исследованные реагенты не оказывали положительного эффекта на течение процесса (данные не приведены). В правильно подобранных условиях ренатурации наблюдалось автокаталитическое отщепление энтеропептидазы с высвобождением L-НЕР.

Активность фермента в ренатуратах оценивали электрофоретически по степени расщепления мГБ-1 и/или мГБ-2 (рис. 2, 3, 4). По результатам исследований было установлено, что наиболее эффективная ренатурация, и, как следствие, более глубокое расщепление модельных гибридных белков образующейся энтеропептидазой, наблюдалась в буферном растворе, содержащем 20% глицерин.

Для оценки количества активного фермента в ренатуранте, содержащем 20% глицерин, препарат очистили на сорбенте STI-Sepharose (сефароза, конъюгированная с ингибитором трипсина сои). Аффинная хроматография использовалась только для контроля процесса ренатурации и не применялась в технологическом процессе. Аликвоту ренатурата пропускали через аффинный сорбент и определяли количество связавшейся L-НЕР по отношению к общему количеству фермента. В результате оказалось, что на сорбенте связалось около 2% фермента от общей массы L-НЕР, что составило 0.02 мг активного фермента в 1 мг L-НЕР. Таким образом, в ходе разработанной технологии ренатурации был достигнут такой же выход активного фермента, как и в методике лабораторной технологии [11], но с меньшими трудозатратами и сокращением времени производства.

Подбор условий расщепления модельных гибридных белков и определение активности полученной легкой цепи энтеропептидазы человека привел к следующим результатам: расщепление мГБ-1 прошло более чем на 85% в течение 30 минут при температуре 25°C и массовом соотношении фермент субстрат 1 : 100 (массовое соотношение с учетом активной L-HEP составило 1 : 5000), или в течение 60 мин при массовом соотношении фермент–субстрат 1 : 200 (массовое соотношение с учетом активной L-HEP составило 1 : 10000). Расщепление мГБ-2 прошло более чем на 85% в течение 24 часов при температуре 25°C и массовом соотношении фермент/субстрат 1 : 50 (массовое соотношение с учетом активной L-HEP составило 1 : 2500). На основе полученных результатов была разработана опытно-промышленная технология получения легкой цепи энтеропептидазы человека и наработана партия ферментного препарата. Выход активного фермента составил 100 мг с 1 л культуральной жидкости. Полученный препарат был успешно использован при получении инновационного анальгетика Пуротоксин-6 и Интерферона альфа-2b.

Разработка технологии получения рекомбинантного гибридного белка t-L-HEP

При использовании ферментных препаратов для получения рекомбинантных белков различного назначения часто возникают проблемы, связанные с необходимостью удаления фермента из реакционной смеси, например, для остановки ферментативной реакции, очистки целевого продукта от следовых количеств фермента и т.д. Для этого в структуру целевого белка вводят аффинные метки, позволяющие существенно облегчить такие процедуры [20, 21]. Для решения подобных задач мы создали новую генно-инженерную конструкцию гибридной L-HEP, содержащую в своей структуре пептидные аффинные метки, позволяющие количественно удалять фермент из любой смеси и на любой стадии получения, выделения и очистки белков.

Для этого был сконструирован экспрессионный плазмидный вектор pL-HEP-H6-CBD, кодирующий гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность легкой цепи энтеропептидазы человека, в *N*-концевой части которой расположен специфический сайт узнавания L-HEP, DDDDK-, а в *C*-концевой – полигистидиновая последовательность (H6 и хитин-связывающий домен (CBD) (рис. 5).

Экспрессионный вектор был трансформирован в *E. coli* BL21(DE3). В первичной структуре L-HEP содержатся остатки цистеина (которые образуют четыре дисульфидные связи), что значительно затрудняет правильный фолдинг экспрессированного белка [20]. В полученном штамме-

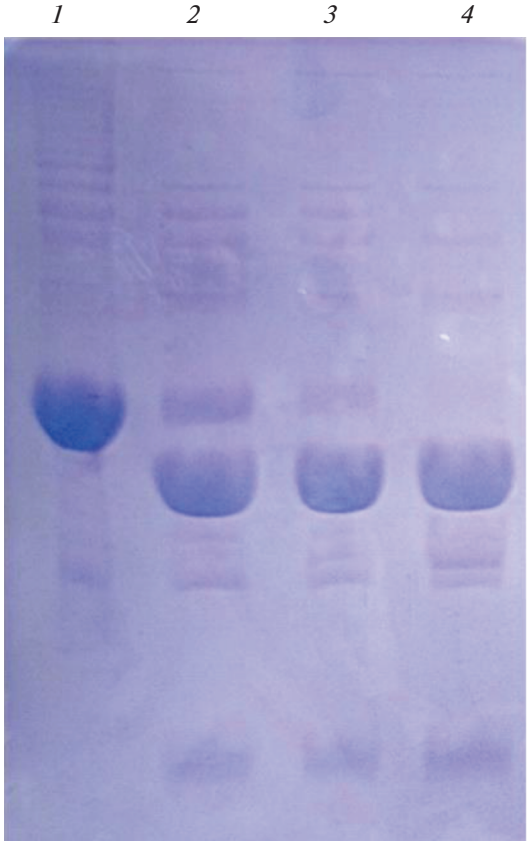


Рис. 3. Электрофореграмма кинетики расщепления модельного гибридного белка 2 ферментом L-HEP. Массовое соотношение 1 : 50: *1* – мГБ-2, *2* – расщепление энтеропептидазой 8 ч, *3* – расщепление энтеропептидазой 16 ч, *4* – расщепление энтеропептидазой 24 ч.

продуценте *E. coli* BL21(DE3)/pL-HEP-H6-CBD был зафиксирован высокий уровень экспрессии ГБ N-seq – DDDDK – L-HEP – H6 – CBD – 40 г влажной биомассы с 1 л культуры. После индукции большая часть ГБ (~95%) формировала тельца включения. Отмывка, экстракция и ренатурация новой гибридной конструкции проводилась по схеме, отработанной для получения L-HEP.

Оптимизация стадии очистки t-L-HEP

Для очистки t-L-HEP использовали металлхелатную аффинную хроматографию. Обессоливание элюата после аффинной хроматографии проводили с помощью гель-фильтрации. Хроматографическая чистота полученной t-L-HEP составила более 80% (рис. 6).

Таким образом, была создана пилотная технология получения ферментного препарата t-L-HEP. Эффективность ренатурации сохранилась и осталась соответствующей лабораторным результатам, полученным для L-HEP [17]. Однако оптимиза-

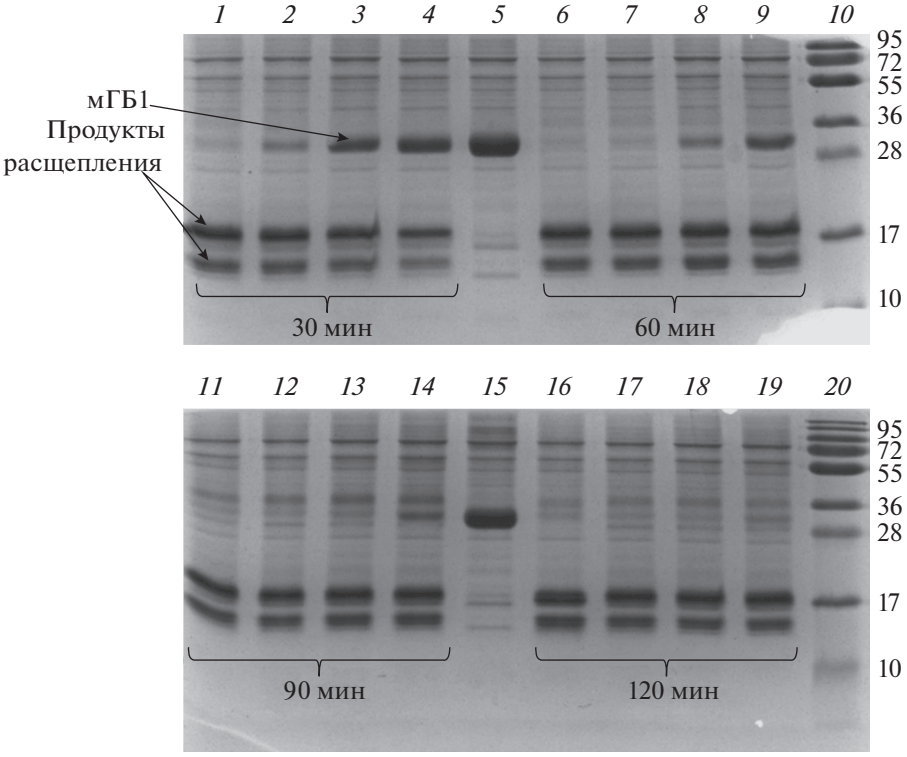


Рис. 4. Электрофореграмма кинетики расщепления модельного гибридного белка 1 ферментом L-HEP. Расщепление мГБ-1 с L-HEP в массовом соотношении фермент : субстрат 1 : 50; 1 : 100; 1 : 200; 1 : 400 (массовое соотношение с учетом активной L-HEP 1 : 2500; 1 : 5000; 1 : 10000; 1 : 20000), соответственно, за 30 мин (дорожки *1–4*), за 60 мин (дорожки *6–9*), за 90 мин (дорожки *11–14*) и за 120 мин (дорожки *16–19*). Дорожки *5* и *15* представляют белок мГБ-1 до расщепления. Дорожки *10* и *20* – маркеры молекулярных масс.

ция процесса и масштабирование лабораторной методики, позволили получить значительные количества ферментного препарата. Невысокий выход на стадии ренатурации компенсируется простотой и хорошей воспроизводимостью технологии выделения и очистки t-L-HEP. Выход активного гибридного фермента t-L-HEP (L-HEP – H6 – CBD) составил 65.2 мг с 1 л культуральной жидкости.

Иммобилизация t-L-HEP на хитиновой смоле

Иммобилизация ферментов является одним из возможных вариантов решения проблемы снижения материальных издержек при производстве рекомбинантных белков различного назначения. Такая возможность была предусмотрена нами в структуре гибридного белка t-L-HEP, содержащей аминокислотную последовательность хитин-связывающего домена – CBD. Иммобилизацию t-L-HEP осуществляли на хитиновой смоле (рис. 7), условия имммобилизации приведены в Экспериментальной части. Емкость сорбента по белку составила 1 мг/мл.

Активность i-t-L-HEP определяли по расщеплению мГБ-1. Через 0.5 мл сорбента с иммобилизованным ферментом (i-t-L-HEP) пропускали 10 мл раствора мГБ-1 (3 мг/мл). В ходе эксперимента время контакта субстрата с i-t-L-HEP контролировали скоростью потока через сорбент (от 0.5 до 4 мл/мин). В результате установлено, что 12 секунд контакта мГБ-1 с i-t-L-HEP (0.5 мг в объеме 0.5 мл) достаточно для количественного расщепления мГБ-1, данное время соответствует скорости потока 2.5 мл/мин. Была определена стабильность иммобилизованного фермента. Показано вплоть до 3 цикла отсутствие снижения ферментативной активности i-t-L-HEP, при этом активность иммобилизованного фермента после шестого цикла снизилась не более чем на 10%, что позволит использовать фермент многократно (рис. 8). При скоростях потока больше 2.5 мл/мин происходила деформация сорбента и десорбция иммобилизованного фермента. Это свидетельствует о невысокой операционной стабильности препарата иммобилизованного фермента, что может ограничить возможности его использования.

Таким образом, в результате проведенных исследований создана новая структура гибридного белка t-L-HEP (L-HEP – H6 – CBD) способного расщеплять белки по специфическому сайту энтеропептидазы, разработан эффективный биотехнологический способ получения двух вариан-

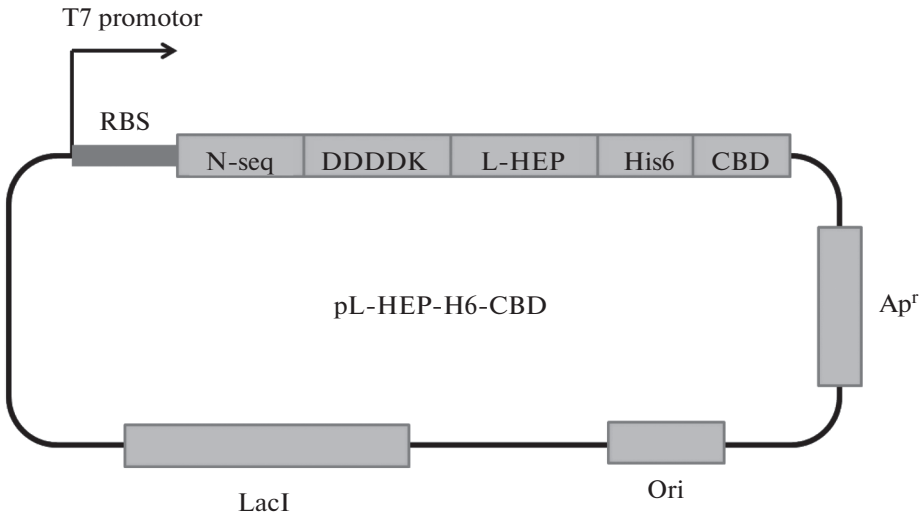


Рис. 5. Физическая карта плазмиды pL-HEP-H6-CBD. ori – ориджин репликации, Ap^r – ген резистентности к ампициллину, lacI – ген репрессора лактозного оперона, T7 promoter – промотор бактериофага T7, RBS – сайт связывания с рибосомой, N-seq – DDDDK-L-HEP-H6-CBD – нуклеотидная последовательность, кодирующая гибридный белок, включающий аминокислотные последовательности специфического сайта узнавания энтеропептидазы, легкой цепи энтеропептидазы человека, гексагистидинового домена и хитин-связывающего домена.

тов рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы человека, L-HEP и t-L-HEP, содержащей каскад из двух аффинных меток, осуществлена иммобилизация ферментного препарата t-L-HEP. Показано сохранение активности иммобилизованного фермента в течение 6 циклов. Обнаружены особенности функционирования i-t-L-HEP, связанные с механическими свойствами носителя. В дальнейшем планируется оптимизация условий использования иммобилизованных ферментов на хитиновых носителях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В исследовании использовали следующие реактивы: натрия хлорид (Panreac, Испания), едкий натр (Panreac, Испания), дрожжевой экстракт (Sigma-Aldrich, США), этанол (Panreac, Испания), ледяную уксусную кислоту (Panreac, Испания) мочевину (Sigma-Aldrich, США); акриламид (Panreac, Испания), Трис (трис(гидроксиметил)аминометан) (Panreac, Испания) акриламид/бисакриламид 29/1 (Sigma Aldrich, США), персульфат аммония (Merck), бромфеноловый синий (BioRad, США); Кумасси R 250 (BioRad, США), хлороводородную кислоту (Panreac, Испания), дитиотреитол (DTT) (Sigma-Aldrich, США), додецилсульфат натрия SDS (Sigma-Aldrich, США), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Sigma-Aldrich, США), ампициллин (Sigma-Aldrich, США), бактотриптон (Sigma-Aldrich, США), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), молекулярный

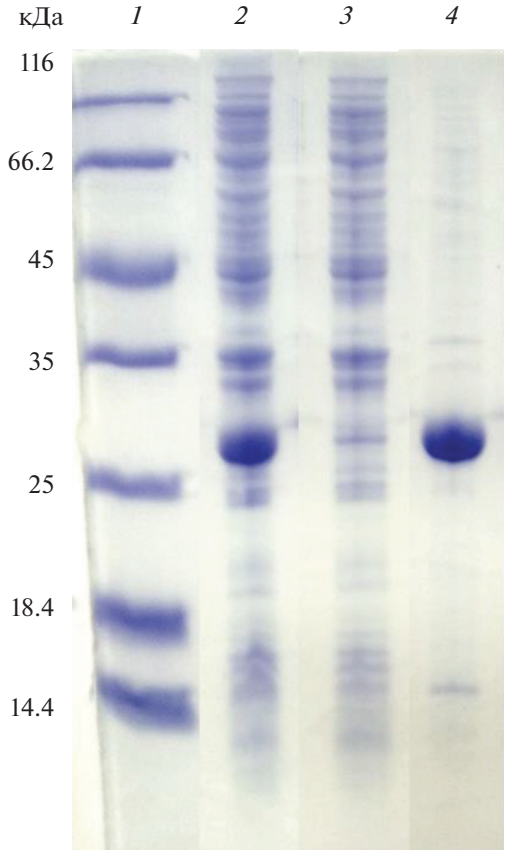


Рис. 6. Электрофореграмма белковых фракций при очистке t-L-HEP с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии: *1* – маркеры молекулярных масс, *2* – исходное нанесение, *3* – элюат примесных белков, *4* – элюат t-L-HEP.

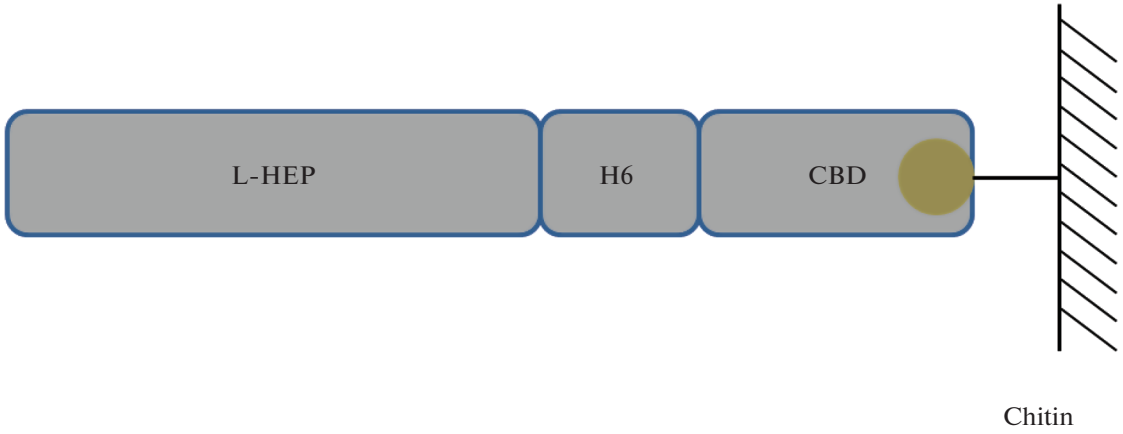


Рис. 7. Схематическое изображение иммобилизованного фермента i-t-L-HEP.

маркер Unstained Protein Molecular Weight Marker #26610 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Среда LB [23].

В исследовании использовался штамм *E. coli*. BL21(DE3) генотип: *E. coli* str.BF– ompTgaldcm-lonhsdSB(rB–mB–) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 p07 ind1 sam 7 nin 5]) [malB+] K-12 (λS).

В работе использовали хитиновый сорбент производства NEB (Англия). Емкость сорбента – 2 мг мальтоза-связывающего белка/мл сорбента, размер частиц 50–60 микрон.

Все генно-инженерные конструкции выполнены по аутсорсингу в компании ЗАО Евроген (Россия).

Модельные гибридные белки, мГБ-1 и мГБ-2, получены на Опытном биотехнологическом производстве ИБХ РАН с использованием технологии рекомбинантной ДНК и экспрессией в *E. coli*.

Создание штамма продуцента E. coli BL21(DE3)/p-L-HEP-H6-CBD (pET-32a/L-HEP)

Плазмидами pL-HEP-H6-CBD или pET-32a/L-HEP трансформировали компетентные клетки (*E. coli* штамм BL21(DE3)). Трансформанты высевали на агаризованную среду с ампицилином и инкубировали в течение 20 ч при 37°C. Выросшие колонии с помощью петли в стерильных условиях переносили в питательную среду LB с ампицилином объемом 4 мл и культивировали в течение 16 часов при 37°C. Полученной ночной культурой засевали 6 мл питательной среды LB, содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, и инкубировали на инкубаторе-шейкере INNOVA 40R (New Brunswick, США), при 37°C 200 об./мин. до значений оптической плотности культуры 0.9 опт. ед. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре ПЭ-5300ВИ (Экохим, Россия) при длине волны 600 нм, используя в качестве контроля питательную среду. Затем производили индукцию биосинтеза целевого ГБ добавлением 1000 кратного раствора изопропил-β-D-тиогалактопиранозида (ИПТГ) до конечной концентрации 0.22 ммоль/л, после чего культуру инкубировали в течение 4 часов при 37°C. По окончании культивирования осадок отделяли путем центрифугирования на центрифуге 260D (DENVILL, США) 14000 *g* в течение 10 мин при комнатной температуре. Клеточный лизат анализировали на наличие целевого гибридного белка с помощью электрофореза по Лэммли [23]. По результатам анализа был выбран клон с наибольшим уровнем экспрессии целевого гена. Суспензию клеток замораживали при –72°C с добавлением глицерина до конечной концентрации 15%.

Выращивание инокулята штамма E. coli BL21(DE3)/pL-HEP-H6-CBD (pET-32a/L-HEP) для засева ферментера

Два литра среды LB, содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, засевали размороженной суспензией клеток *E. coli* BL21(DE3)/pL-HEP-H6-CBD (или pET-32a/L-HEP) в количестве 0.1% и культивировали в качалочных колбах в течение ночи (14 ч) при 32°C (170 об./мин). Оптическая плотность посевной культуры составила (4.9) опт. ед. Общий объем инокулята составил 2 л.

Культивирование штамма-продуцента E. coli BL21(DE3)/pL-HEP-H6-CBD (pET-32a/L-HEP) в ферментере

Ферментацию штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pL-HEP-H6-CBD (или pET-32a/L-HEP) проводили в 200 л ферментере (MBR, Швейцария), содержащем стерильную питательную среду LB. Культивирование штамма-продуцента проводили при температуре 37°C, pH 7.0. Продолжи-

тельность культивирования 12.0 ч. Через 7–7.5 часов от начала культивирования (при достижении оптической плотности культуральной жидкости, равной 28–30 оптическим единицам) проводили индукцию биосинтеза гибридного белка в клетках культуры посредством введения в ферментер водного раствора ИПТГ до конечной концентрации 0.22 ммоль/л. Через 4–4.5 часа после введения в аппарат индуктора биосинтеза гибридного белка процесс останавливали. Во время культивирования осуществляли наблюдение за процессом, фиксируя значения показателей: время роста, температура культивирования, pO2, pH, оптическая плотность при длине волны 600 нм. Сбор биомассы клеток осуществляли на проточной центрифуге Z81 G (SEPA, Германия) при температуре 20°C. Было получено 8 кг влажной биомассы.

Разрушение биомассы

Полученную биомассу в количестве 500 г суспендировали в буферном растворе (50 мМ Трис/HCl, 10 мМ ЭДТА, pH 8) в соотношении 1 : 10 и гомогенизировали на лабораторном гомогенизаторе APV–1000 (Германия) при температуре 5°C. Степень разрушения клеток определяли микроскопированием. Разрушенную клеточную суспензию центрифугировали на центрифуге 34 Z383K Hermle Labor Technik (Германия) при 11500 об./мин, 40 мин, 5°C. Полученные тельца включения (ТВ) взвешивали. Было получено 40 г биомассы с одного литра культуральной жидкости.

Отмывка телец включения, экстракция и ренатурация

ТВ отмывали буферным раствором, содержащим тритон X-100 (50 мМ Трис/HCl, 0.1% Triton X-100, pH 8) или мочевину (50 мМ Трис/HCl, 2 М мочевина, pH 8) в соотношении 1 : 10, после чего суспензию центрифугировали (5000 *g*, 20 мин, 4°C). Если использовали буферный раствор, в состав которого входил тритон X-100, то ТВ далее трижды промывали буфером 50 мМ Трис/HCl, pH 8. Если использовали буфер, содержащий мочевину, то ТВ промывали буфером 50 мМ Трис/HCl, pH 8 один раз.

ТВ экстрагировали буферным раствором 50 мМ Трис, 6 М мочевина, pH 10 в соотношении 1 : 10. Солюбилизированый белок разбавляли буфером для ренатурации (50 мМ Трис, 20% глицерин, pH 10) до конечной концентрации белка 0.7 мг/мл и инкубировали при 25°C в течение 18 ч.

Аффинная хроматография гибридного белка

В работе использовали хроматографическую систему Akta Basic 100 (GE, США), и колонку XK 26/40 (GE, США), заполненную сорбентом Ni Sepharose® 6 Fast Flow (GE, США) объемом 43 мл, который перед нанесением раствора белка был уравновешен сначала тремя объемами 100 мМ раствора $NiSO_4$, а затем тремя объемами буферного раствора (50 мМ Трис/HCl, 0.5 М NaCl, pH 8). Перед нанесением на колонну pH ренатурационной смеси доводили до 8 добавлением раствора соляной кислоты, а также добавляли хлористый натрий до конечной концентрации 0.5 М. После нанесения белкового раствора сорбент промывали двумя объемами буфера (50 мМ Трис/HCl, 0.5 М NaCl, pH 8) и элюировали сорбировавшийся белок двумя объемами буфера, содержащего имидазол (0.250 М имидозол, 25 мМ Трис/HCl, 0.5 М NaCl, pH 8). Скорость потока составляла 5 мл/мин.

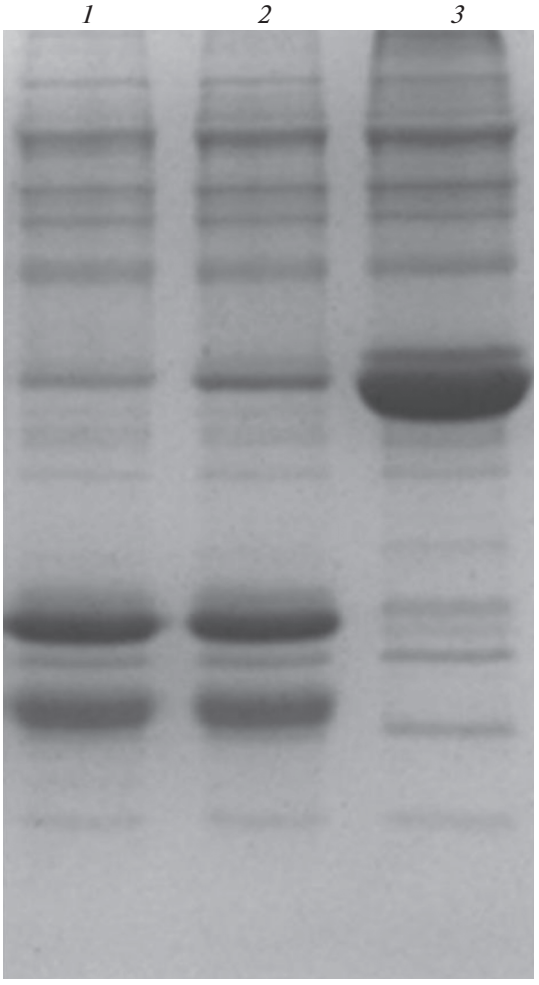


Рис. 8. Электрофореграмма расщепления модельного гибридного белка 1 (25°C, время контакта 12 с) иммобилизованным ферментом i-t-L-HEP; *1* – третий цикл, *2* – шестой цикл, *3* – отрицательный контроль.

Гель-фильтрация

В работе использовали хроматографическую систему Akta Basic 100 (GE, США) с колонкой XK

16/100 (GE, США), заполненной сорбентом Sephadex G-25 (GE, США), объемом 170 мл. Сорбент перед нанесением раствора белка уравновешивали тремя объемами буферного раствора (50 мМ Трис/HCl, pH 8), 20 мл элюата после аффинной хроматографии наносили со скоростью 1 мл/мин, элюцию белка проводили тем же буфером.

Иммобилизация t-L-HEP на хитиновом сорбенте

1 мл хитинового сорбента (NEB, Англия) уравновешивали 3 объемами буферного раствора 50 мМ Трис/HCl, 100 мМ NaCl, pH 8, а затем наносили на него 10 мл раствора t-L-HEP с концентрацией 1 мг/мл со скоростью 1 мл/мин. После нанесения раствора белка сорбент промывали тремя объемами исходного буферного раствора.

Расщепление модельных ГБ

Активность рекомбинантной L-HEP, t-L-HEP и ее иммобилизованного варианта, i-t-L-HEP, определяли с помощью электрофоретического метода по степени расщепления модельных гибридных белков, Trx-интерферон альфа-2b (модельный гибридный белок 1, мГБ-1) или Trx-пуротоксин-6 (модельный гибридный белок 2, мГБ-2), содержащих специфический сайт узнавания энтеропептидазы. В 10 мл белкового раствора, содержащего модельный гибридный белок с концентрацией 3 мг/мл, вносили L-HEP или t-L-HEP в соотношениях фермент/субстрат 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200 и 1 : 400. Общие условия реакции: 50 мМ Трис/HCl, pH 8, 25°C, 1–24 ч. При использовании мГБ-1 добавляли ДТТ до конечной концентрации 0.5 мМ.

Через 0.5 мл i-t-L-HEP пропускали 10 мл раствора мГБ-1 в 50 мМ Трис/HCl, pH 8, 0.5 мМ ДТТ при 25°C, время контакта субстрата с ферментом от 12 до 60 с. Процедуру проводили 6 раз. В процессе отбирали пробы для электрофоретического анализа.

Аналитические методы контроля

Электрофоретический анализ белковых растворов осуществляли, используя систему PowerPac HC (BioRad, США), в 15% ПААГ по Лэммли [23]. Гели окрашивали раствором Coumassi R-250 (2.5 мг/мл). Концентрацию белка в растворах измеряли с помощью спектрофотометра Ultrospec – 1000 (Amersham Pharmacia Biotech, Great Britain) по методу Бредфорда [24].

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kaur J., Kumar A., Kaur J.* // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 106. P. 803–822. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080
2. *Waugh D.S.* // Protein Expr. Purif. 2011. V. 80. P. 283–293. https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.005
3. *Barrett A., Rawlings N.D., Woessner J.* // Elsevier, London, 2004. 2nd ed. P. 1513–1517.
4. *Zheng X.L., Kitamoto Y., Sadler J.E.* // Front. Biosci. (Elite Ed). 2009. V. 1. P. 242–249.
5. *Kitamoto Y., Veile R.A., Donis-Keller H., Sadler J.E.* // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 4562–4568. https://doi.org/10.1021/bi00014a008
6. *Lu D., Yuan X., Zheng X., Sadler J.E.* // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 31293–31300. https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31293
7. *Lu D., Fütterer K., Korolev S., Zheng X., Tan K., Waksman G., Sadler J.E.* // J. Mol. Biol. 1999. V. 292. P. 361–373. https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3089
8. *Light A., Janska H.* // Trends Biochem. Sci. 1989. V. 14. P. 110–112. https://doi.org/10.1016/0968-0004(89)90133-3
9. *Mann N.S., Mann S.K.* // Exp. Biol. Med. 1994. V. 206. P. 114–118. https://doi.org/10.3181/00379727-206-43728
10. *Light A., Janska H.* // J. Protein Chem. 1991. V. 10. P. 475–480. https://doi.org/10.1007/bf01025475
11. *Gasparian M.E., Ostapchenko V.G., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P.* // Biochem. 2006. V. 71. P. 113–119. https://doi.org/10.1134/S0006297906020015
12. *LaVallie E.R., Rehemtulla A., Racie L.A., DiBlasio E.A., Ferenz C., Grant K.L., Light A., McCoy J.M.* // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 23311–23317.
13. *Svetina M., Krasevec N., Gaberc-Porekar V., Komel R.* // J. Biotechnol. 2000. V. 76. P. 245–251. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00191-1
14. *Choi S.I., Song H.W., Moon J.W., Seong B.L.* // Biotechnol. Bioeng. 2001. V. 75. P. 718–724. https://doi.org/10.1002/bit.10082
15. *Melicherová K., Krahulec J., Šafránek M., Lišková V., Hopková D., Széliová D., Turňa J.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 101. P. 1927–1934. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7960-3
16. *Azhar M., Somashekhar R.* // Prep. Biochem. Biotechnol. 2015. V. 45. P. 268–278. https://doi.org/10.1080/10826068.2014.907185
17. *Gasparian M.E., Ostapchenko V.G., Schulga A.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P.* // Protein Expr. Purif. 2003. V. 31. P. 133–139. https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00159-1
18. *Chun H., Joo K., Lee J., Shin H.-C.* // Biotechnol. Lett. 2011. V. 33. P. 1227–1232. https://doi.org/10.1007/s10529-011-0562-3

19. *Simeonov P., Berger-Hoffmann R., Hoffmann R., Strater N., Zuchner T.* // Protein Eng. Des. Sel. 2011. V. 24. P. 261–268. https://doi.org/10.1093/protein/gzq104

20. *Skala W., Goettig P., Brandstetter H.* // J. Biotechnol. 2013. V. 168. P. 421–425. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.022

21. *Tan H., Wang J., (Kent) Zhao Z.* // Protein Expr. Purif. 2007. V. 56. P. 40–47. https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.07.006

22. *Bertani G.* // J. Bacteriol. 1951vol. 62. P. 293–300.

23. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

24. *Bradford M.M.* // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.

Development of the Pilot Technology for Production of Recombinant Human Enteropeptidase Light Chain in Soluble and Immobilized Forms

D. A. Makarov*, #, A. A. Zinchenko*, V. N. Stepanenko*, D. S. Kalinin*, **, T. D. Melikhova*, E. A. Nokel*, M. E. Gasparyan*, I. V. Myagkih*, and D. A. Dolgikh*, **

#Phone: +7 (985) 699-77-47; e-mail: youngchemist@mail.ru

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

***Lomonosov Moscow State University, GSP-1, Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia*

Enteropeptidase, a proteolytic enzyme of EC 3.4.21.9, is a glycoprotein consisting of two heavy and light polypeptide chains. The light chain of the enzyme is a serine proteinase, recombinant variants of which are used in biotechnology for the cleavage of peptide bonds in hybrid proteins after a specific recognition site DDDDK- or DDDDR-. We have developed a pilot method for producing a recombinant human enteropeptidase light chain containing a cascade of two affinity tags. The constructed expression plasmid vector pL-HEP-H6-CBD encoding a fusion protein containing a human enteropeptidase light chain sequence, metal binding and chitin binding domains was transformed into *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) and, after expression of the HEP-H6-CBD fusion protein, relatively simple scheme for renaturation and purification of the enzyme was developed. After immobilization of the purified preparation on a chitin carrier, the enzyme retained the activity of specific cleavage of substrates for at least 6 cycles.

Keywords: recombinant protein, enteropeptidase, immobilized enzyme

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 686–692

УДК 547.415.057

СИНТЕЗ (3*R*,10*R*)- И (3*S*,10*S*)-ДИАСТЕРЕОМЕРОВ 3,10-ДИМЕТИЛСПЕРМИНА

© 2020 г. М. А. Хомутов*, М. Т. Хивонен, А. И. Салихов*, А. О. Чижов***, И. М. Рыжов****, С. Н. Кочетков*, Й. Вепсалайнен**, Т. А. Кейнанен**, А. Р. Хомутов*, #**

**Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32*

***Департамент Фармации, Биоцентр Куопио, Университет Восточной Финляндии, Куопио, FI-70210 Финляндия*

****Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Россия, 119991 Москва*

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

Поступила в редакцию 18.04.2020 г.
После доработки 26.04.2020 г.
Принята к публикации 30.04.2020 г.

Предложен простой и удобный десятистадийный способ синтеза неизвестных ранее диастереомеров 1,12-диамино-3,10-диметил-4,9-диазадодекана (3,10-Me_2Spm), исходя из коммерчески доступных энантиомеров 2-(Boc-амино)-1-пропанола. Целевые соединения были получены в граммовых количествах с высокой энантиомерной чистотой. Поскольку биохимические свойства диастереомеров 3,10-Me_2Spm определяются конфигурацией хиральных центров, эти соединения представляют интерес не только для исследования ферментов метаболизма спермина и изучения его клеточных функций, но также и для изучения особенностей заболеваний, обусловленных нарушениями метаболизма спермина.

Ключевые слова: полиамины, аналоги спермина, (3R,10R)- и (3S,10S)-3,10-Me_2Spm, сперминоксидаза, ацетилполиаминоксидаза

DOI: 10.31857/S0132342320060123

ВВЕДЕНИЕ

Биогенные полиамины спермин (Spm), спермидин (Spd) и их предшественник путресцин (Put) представляют собой низкомолекулярные поликатионы и присутствуют в клетках всех типов в μM–mM концентрациях, что, соответственно, и определяет множественность их клеточных функций, большинство из которых жизненно необходимы [1, 2]. Нарушение внутриклеточного содержания полиаминов сопутствует различным заболеваниям, таким как атеросклероз, инсульт, некоторые виды панкреатита, синдром Шнайдера-Робинсона, болезни Альцгеймера и Паркинсона, а также сопровождает воспалительные процессы и заболевания, связанные со снижением иммунного ответа [3–8]. Содержание полиаминов в опухолевых клетках повышено, а соединения, способные понижать их уровень, обладают противоопухолевой активностью [9] и используются также в период ремиссии [10].

Синдром Шнайдера-Робинсона – редкое заболевание, возникающее вследствие мутаций в гене сперминсинтазы человека, приводящих к значительному снижению количества Spm и увеличению содержания Spd во многих тканях, включая и мозг. Заболевание характеризуется умственной отсталостью, остеопорозом, гипотонией, нарушениями речи и судорогами [11]. Обработка Spm клеточных линий, полученных от пациентов с этим диагнозом, нормализует соотношение Spd/Spm, но для терапии (*in vivo*) подобный подход не пригоден [12] из-за легкости превращения Spm в Spd (рис. 1). Кроме того, Spm легко подвергается окислительному расщеплению как с участием сперминоксидазы (SMOX), так и с участием N^1-ацетилполиаминооксидазы (PAOX) (рис. 1), вследствие чего образуются токсичные акролеин и перекись водорода [1, 9].

Однако для лечения синдрома Шнайдера-Робинсона могут быть полезны функционально-активные, метаболически устойчивые миметики Spm.

Сокращения: dcAdoMet – декарбоксилированный *S*-аденозил-*L*-метионин; PAOX – N^1-ацетилполиаминоксидаза; 1,12-Me_2Spm – 2,13-диамино-5,10-диазатетрадекан; 3,10-Me_2Spm – 1,12-диамино-3,10-диметил-4,9-диазадодекан; Put – путресцин (1,4-диаминобутан); Spd – спермидин (1,8-диамино-4-азаоктан); Spm – спермин (1,12-диамино-4,9-диазадодекан); SMOX – сперминоксидаза; SSAT – спермидин/спермин N^1-ацетилтрансфераза.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 135-60-65; эл. почта: alexkhom@list.ru).

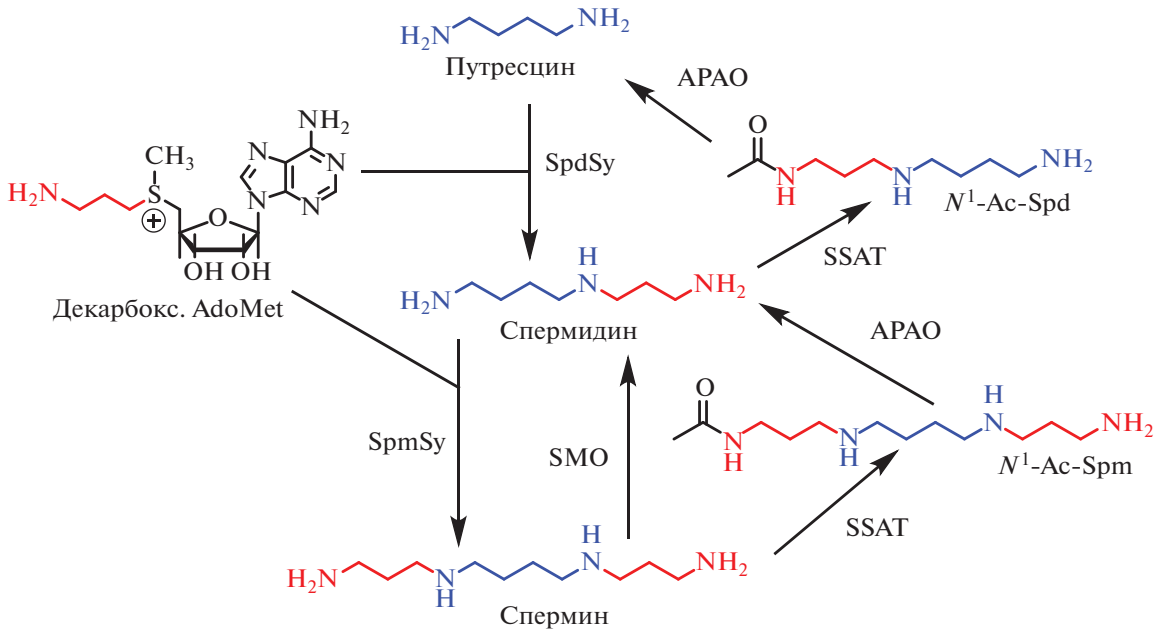


Рис. 1. Катаболизм и взаимопревращения полиаминов. PAOX – ацетилполиаминоксидаза; SSAT – спермидин/спермин-N^1-ацетилтрансфераза; SMOX – сперминоксидаза; SpdSy – спермидинсинтаза; SpmSy – сперминсинтаза.

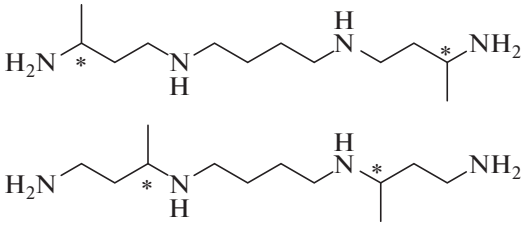
(1*R*,12*R*)-1,12-Me_2Spm (рис. 2) является аналогом Spm с требуемым набором свойств и не проявляет субстратных свойств ни в отношении спермидин/спермин-N^1-ацетилтрансферазы (SSAT), ни в отношении SMOX (рис. 1), тогда как (1*S*,12*S*)-1,12-Me_2Spm оказался в два раза лучшим субстратом SMOX по сравнению с природным Spm [13]. Недавно было показано, что (1*R*,12*R*)-1,12-Me_2Spm (рис. 2) – первое и единственное соединение, которое существенно снижает уровень Spd и возвращает соотношение Spd/Spm к нормальному уровню в различных органах модельных трансгенных мышей, используемых для изучения синдрома Шнайдера-Робинсона [14]. Однако использование (1*R*,12*R*)-1,12-Me_2Spm в дозах выше 50 мг/кг невозможно из-за его токсичности, обусловленной индукцией SSAT [14].

Клеточные эффекты рацемических *бис*-метилированных аналогов Spm определяются положением метильной группы. Так, рацемический 3,10-Me_2Spm, в отличие от 1,12-Me_2Spm, не индуцирует SSAT в клетках DU145 [16]. Соответственно, один из диастереомеров 3,10-Me_2Spm может оказаться удобным инструментом для изучения синдрома Шнайдера-Робинсона *in vivo* в модельных системах. В настоящей статье мы описываем простой и удобный способ синтеза неизвестных ранее диастереомеров (3*R*,10*R*)- и (3*S*,10*S*)-3,10-Me_2Spm (рис. 2), которые обладают очевидным биохимическим и, возможно, терапевтическим потенциалом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ключевой стадией синтеза аналогов и производных полиаминов служит создание *C*–*N*-связей в “скелете” полиаминов, и для этих целей используются разнообразные методы [17]. Ранее мы описали удобный способ синтеза, позволяющий получить рацемический 3,10-Me_2Spm, исходя из 4-амино-2-бутанола, в качестве предшественника трех-углеродного фрагмента этого аналога [16]. Однако изомеры 4-амино-2-бутанола коммерчески недоступны.

В настоящей работе в качестве исходных веществ для получения диастереомеров 3,10-Me_2Spm нами были использованы (2*R*)- и (2*S*)-изомеры 2-(Boc-амино)-1-пропанола ((**Ia**) и (**Iб**) соответственно), которые сначала превращали в Boc-защищенные аминонитрилы согласно описанному в работе [18], а последующее мягкое восстановление с использование $LiAlH_4$ при –5°C без рацемизации приводило к *N*-Boc-диаминам (**IIa**) и (**IIб**) [15]. Карбобензоксилирование свободной аминогруппы давало (3*R*)- и (3*S*)-N^1-Cbz-N^3-Boc-диамины (**III**), а последующее удаление Boc-защитной группы позволило синтезировать (3*R*)- и (3*S*)-N^1-Cbz-диамины (**IV**) с практически количественным выходом. Дальнейшие превращения включали в себя получение нозильных производных (**Va**) и (**Vб**) и их алкилирование 1,4-дийодбутаном в DMF при 40°C в течение 48 ч в присутствии K_2CO_3 (схема 1). Для удаления не вошедших в реакцию изомеров (**Va**) и (**Vб**), к реакционной смеси прибавляли BnBr (15 мол. %) и инкубировали еще 14 ч при 20°C. Затем Ns-защитные группы удаляли



(1*R*,12*R*)- и (1*S*,12*S*)-1,12-Me_2Spm [15]

(3*R*,10*R*)- и (3*S*,10*S*)-1,10-Me_2Spm

Рис. 2. Структура диастереомеров *бис*-метилированных аналогов Spm.

"one-pot" действием $PhSH/K_2CO_3$ в DMF, а соединения (**VIa**) и (**VIб**) выделяли колоночной хроматографией на силикагеле. Последующее удаление Cbz-групп каталитическим гидрированием над Pd-чернью и кристаллизация из MeOH-EtOH позволили получить целевые тетрагидрохлориды (3*R*,10*R*)- и (3*S*,10*S*)-3,10-Me_2Spm's (**VIIa**) и (**VIIб**) с суммарными выходами 18 и 16% (10-ти стадийный синтез), считая на исходные (2*R*)- и (2*S*)-*N*-Boc-аланинолы соответственно.

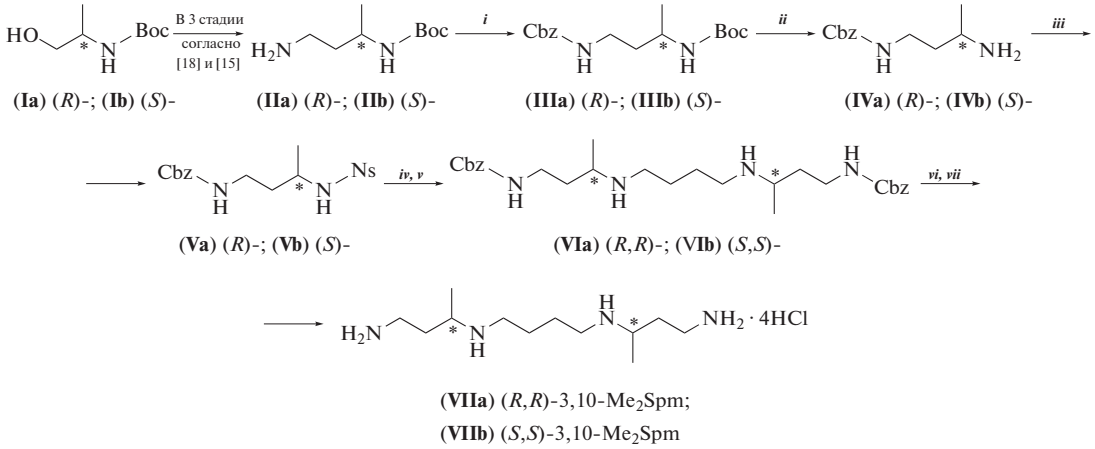


Схема 1. Синтез (3*R*,10*R*)- и (3*S*,10*S*)-диастереомеров 3,10-Me_2Spm. ***i*** – $CbzCl/H_2O/NaHCO_3/THF$; ***ii*** – HCl/MeOH; ***iii*** – $NsCl/CH_2Cl_2/Et_3N$; ***iv*** – $J(CH_2)_4J/DMF/K_2CO_3/45°C$; ***v*** – $PhSH/DMF/K_2CO_3$; ***vi*** – $H_2/Pd/AcOH/MeOH$; ***vii*** – вод. HCl.

Предложены и реализованы удобные схемы синтезов, позволяющие получать граммовые количества диастереомеров 3,10-Me_2Spm с высокими суммарными выходами и оптической чистотой. Полученные диастереомеры 3,10-Me_2Spm могут быть полезными инструментами в изучении ферментов метаболизма полиаминов, и, весьма вероятно, будут обладать различной активностью в экспериментах с культурами клеток и *in vivo* в случае моделей синдрома Шнайдера-Робинсона.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

При выполнении работы были использованы следующие реактивы: бензиловый эфир хлоругольной кислоты (CbzCl), тиофенол, хлорангидрид 2-нитробензолсульфокислоты (NsCl), триэтиламин (Et_3N), – все фирмы Aldrich (США). Синтезы (3*R*)- и (3*S*)-N^3-(*трет*-бутилоксикарбонил)-1,3-диаминобутанов были осуществлены, исходя из соответствующих (2*R*)- и (2*S*)-2-(Boc-амино)-1-пропанолов, (Aldrich (США), кат. № 469505 и 469513, соответственно; оба вещества обладали >98% оптической чистотой) согласно описанному ранее [15].

Колоночную хроматографию выполняли на силикагеле Kieselgel (40–63 μm, Merck, Germany), системы для элюции указаны в тексте. ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F_{254} plates (Merck, Germany) в системах: CH_2Cl_2–MeOH, 100 : 1 (А), диоксан–25% NH_4OH, 95 : 5 (Б); EtOAc–гексан, 2 : 3 (В); и *n*-BuOH–AcOH–Py–H_2O, 4 : 2 : 1 : 2 (Г). Вещества на хроматограммах визуализировали по УФ-поглощению, Boc-производные при помощи бромфенолового синего, а соединения со свободной аминогруппой – используя цветную реакцию с нингидрином.

Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker AM-300 в $CDCl_3$ и D_2O, внутренний стандарт – Me_4Si ($CDCl_3$) и натриевая соль 3-триметилсилилпропан-сульфокислоты (D_2O). Химические сдвиги приведены в миллионных долях, а КССВ – в герцах. Температуру плавления определяли в открытом капилляре на приборе Mel-Temp

1202D фирмы Electrotermals. Величину удельного вращения определяли на приборе 341 Polarimeter фирмы Perkin-Elmer, растворители и концентрации растворов указаны в тексте. Элементный анализ выполняли на CHN-анализаторе Carlo Erba 1106. Масс-спектры высокого разрешения (HR-MS) регистрировали на приборе Bruker maXis методом электрораспылительной ионизации (ESI) [19]. Измерения выполняли на положительных ионах (напряжение на капилляре – 4500 В) в диапазоне *m/z* 50–3000 с использованием внешней калибровки (ESI Tuning Mix, Agilent). Шприцевой ввод тетрагидрохлоридов (**VIIа**)/(**VIIб**) осуществляли в виде их водных растворов, для остальных веществ в качестве растворителя использовали ацетонитрил; скорость потока – 5 мкл/мин; газ-распылитель – азот; температура интерфейса – 180°C.

(3*R*)-N^1-(Бензилоксикарбонил)-N^3-(*трет*-бутилоксикарбонил)-1,3-диаминобутан (IIIа). К охлажденному до 8°C раствору 3.7 г (19.7 ммоль) (3*R*)-N^3-(*трет*-бутилоксикарбонил)-1,3-диаминобутана (**IIа**) и 2.53 г (20.5 ммоль) Et_3N в 60 мл смеси C_6H_6/Et_2O (1 : 2) при перемешивании прибавляли за 40 мин раствор 3.5 г (20.5 ммоль) CbzCl в 15 мл C_6H_6, перемешивали 1 ч при 8°C и 4 ч при 20°C. Осадок отфильтровывали, фильтрат промывали последовательно H_2O (3 × 15 мл), 10% лимонной кислотой (4 × 15 мл), H_2O (10 мл), 5 M NaCl (2 × 15 мл) и высушивали над $MgSO_4$. Растворитель отгоняли в вакууме, остаток очищали колоночной хроматографией на SiO_2 (90 г), элюируя смесью CH_2Cl_2–MeOH, 98 : 2. Фракции, содержащие соединение (**IIIа**), упаривали в вакууме досуха, что привело к густому маслу, затвердевшему при высушивании в вакууме (25°C/0.5 мм Hg). После перекристаллизации из гексана получали 5.2 г (82%) соединения (**IIIа**), т.пл. 82.5–83°C, R_f 0.39 (А), $[\alpha]_D^{20}$ –50.4° (*c* 2.0, CH_2Cl_2). ^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$) δ: 7.39–7.27 (5H, м, Ph), 5.55 (1H, уш.с., NHCbz), 5.09 (2H, с, C<u>H</u>$_2$Ph), 4.31 (1H, уш.с., N<u>H</u>Boc), 3.8–3.69 (1H, м, CH), 3.55–3.35 (1H, м, NHC<u>H</u>$_2$), 3.08–2.91 (1H, м, NHC<u>H</u>$_2$), 1.77–1.63 (1H, м, C<u>H</u>$_2$CH), 1.52–1.32 (10H, м, C(C<u>H</u>$_3$)$_3$ + C<u>H</u>$_2$CH), 1.14 (3H, д, *J* 6.5, CH_3). ^{13}C-ЯМР ($CDCl_3$) δ: 156.59, 156.07, 136.93, 128.58, 128.12, 128.04, 79.50, 66.55, 43.93, 37.94, 37.15, 28.45, 21.60. Найдено, %: C 63.47; H 8.21; N 8.58. $C_{17}H_{26}N_2O_4$. Вычислено, %: C 63.33; H 8.13; N 8.69.

(3*S*)-N^1-(Бензилоксикарбонил)-N^3-(*трет*-бутилоксикарбонил)-1,3-диаминобутан (IIIб). Получали аналогично соединению (**IIIа**), исходя из 2.76 г (14.7 ммоль) соединения (**IIб**) и 2.6 г (15.2 ммоль) Cbz-Cl, что приводило к соединению (**IIIб**) (4.07 г, 86%), т. пл. 82.5–83°C, R_f 0.39 (А), $[\alpha]_D^{20}$ +48.9° (*c* 2.0, CH_2Cl_2). ^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$) δ: 7.40–7.28 (5H, м, Ph), 5.55 (1H, уш.с., NHCbz), 5.05 (2H, с, C<u>H</u>$_2$Ph), 4.35 (1H, уш.с., N<u>H</u>Boc), 3.82–3.65 (1H, м, CH), 3.51–3.33 (1H, м, NHC<u>H</u>$_2$), 3.10–2.88 (1H, м, NHC<u>H</u>$_2$), 1.78–1.61 (1H, м, C<u>H</u>$_2$CH), 1.50–1.34 (10H, м, C(CH$_3$)$_3$ + C<u>H</u>$_2$CH), 1.14 (3H, д, *J* 6.5, CH_3). ^{13}C-ЯМР ($CDCl_3$) δ: 156.61, 156.11, 136.95, 128.58, 128.17, 128.09, 79.54, 66.61, 43.96, 37.97, 37.19, 28.50, 21.69. Найдено, %: C 63.41; H 8.18; N 8.66. $C_{17}H_{26}N_2O_4$. Вычислено, %: C 63.33; H 8.13; N 8.69.

(3*R*)-N^1-(Бензилоксикарбонил)-N^3-(2-нитрофенилсульфонил)-1,3-диаминобутан (Vа). К охлажденному до 0°C раствору 4.76 г (14.8 ммоль) соединения (**IIIа**) в 15 мл абс. EtOH прибавляли 6 мл 10 M HCl/EtOH и через 3 ч при 20°C реакционную смесь упаривали в вакууме досуха. Остаток соупаривали с EtOH (2 × 20 мл), растворяли в EtOH (15 мл), выливали в абс. Et_2O (150 мл) и оставляли на ночь при –20°C. Выделившееся масло отделяли, к остатку прибавляли 2 M NaOH (15 мл) и экстрагировали CH_2Cl_2 (4 × 15 мл). Объединенные CH_2Cl_2-вытяжки последовательно промывали H_2O (2 × 15 мл), 5 M NaCl (2 × 15 мл) и высушивали над K_2CO_3. Растворитель отгоняли в вакууме, остаток высушивали в вакууме над P_2O_5 и получали соединение (**IVа**) (2.7 г, 82%) в виде густого масла, R_f 0.35 (Б). ^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$) δ: 7.39–7.30 (5H, м, Ph), 5.46 (1H, уш.с, NH), 5.10 (2H, с, CH_2Ph), 3.46–3.30 (1H, м, NHC<u>H</u>$_2$), 3.29–3.16 (1H, м, NHC<u>H</u>$_2$), 3.04–2.90 (1H, м, CH), 1.66–1.52 (1H, м, NHCH$_2$C<u>H</u>$_2$), 1.50–1.30 (3H, м, NHCH$_2$C<u>H</u>$_2$ + NH$_2$), 1.10 (3H, д, *J* 6.4, CH_3). ^{13}C-ЯМР ($CDCl_3$) δ: 156.64, 136.91, 128.64, 128.23, 128.19, 66.71, 45.62, 39.23, 29.84, 24.97.

К охлажденному до 4°C раствору 2.64 г (11.9 ммоль) соединения (**IVа**) и 2.13 мл (15.4 ммоль) Et_3N в 25 мл абс. CH_2Cl_2 прибавляли при перемешивании в течение 10 мин раствор 2.68 г (12.1 ммоль) NsCl в 25 мл абс. CH_2Cl_2, перемешивали 1 ч при 4°C и еще 3 ч при 20°C. Осадок отфильтровывали, фильтрат разбавляли 25 мл CH_2Cl_2 и последовательно промывали H_2O (3 × 15 мл), 10% лимонной кислотой (4 × 20 мл), H_2O (15 мл), 5 M NaCl (2 × × 15 мл) и высушивали над $MgSO_4$. Растворитель отгоняли в вакууме, остаток очищали колоночной хроматографией на SiO_2 (160 г), элюируя смесью $CH_2Cl_2 \rightarrow CH_2Cl_2$/MeOH = 100 : 0.5. Фракции, содержащие соединение (**Vа**), упаривали в вакууме досуха и получали 4.1 г (85%, считая на (**IVа**)) соединения (**Vа**), в виде полузакристаллизовавшегося масла, R_f 0.21 (В), $[\alpha]_D^{20}$ –150.8° (*c* 3.0, CH_2Cl_2). ^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$) δ: 8.17–8.09 (1H, м, Ns), 7.89–7.80 (1H, м, Ns), 7.76–7.67 (2H, м, Ns), 7.41–7.29 (5H, м, Ph), 5.25–5.14 (2H, м, NH-Cbz + NH-Ns), 5.10 (2H, с, C<u>H</u>$_2$Ph), 3.66–3.50 (1H, м, CH), 3.47–3.33 (1H, м, NHC<u>H</u>$_2$), 3.29–3.15 (1H, м, NHC<u>H</u>$_2$), 1.87–1.69 (1H, м, NHCH$_2$C<u>H</u>$_2$), 1.61–1.48 (1H, м, NHCH$_2$C<u>H</u>$_2$), 1.04 (3H, д, *J* 6.6, CH_3). ^{13}C-ЯМР

($CDCl_3$) δ: 156.59, 147.98, 136.75, 133.73, 133.07, 130.83, 128.66, 128.23 (2C), 125.57, 66.78, 48.80, 37.65, 37.58, 21.71. HRESIMS: *m/z* вычислено $C_{18}H_{22}N_3O_6S^+$, $[M + H]^+$: 408.1224. Найдено: 408.1221.

(3*S*)-*N*^{1}-(Бензилоксикарбонил)-*N*^{3}-(2-нитрофенилсульфонил)-1,3-диаминобутан (Vб). Получали аналогично соединению (**Va**), исходя из 2.96 г (9.2 ммоль) соединения (**IIIб**) через промежуточное соединение (**IVб**), R_f 0.35 (Б), ^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$) δ: 7.38–7.28 (5H, м, Ph), 5.48 (1H, уш.с., NH), 5.09 (2H, с, CH_2Ph), 3.43–3.30 (1H, м, NHC$\underline{H}_2$), 3.28–3.17 (1H, м, NHC$\underline{H}_2$), 3.02–2.92 (1H, м, CH), 1.64–1.52 (1H, м, $NHCH_2C\underline{H}_2$), 1.48–1.37 (1H, м, $NHCH_2C\underline{H}_2$), 1.22 (2H, уш.с., NH_2), 1.09 (3H, д, *J* 6.4, CH_3). ^{13}C-ЯМР ($CDCl_3$) δ: 156.66, 136.83, 128.63, 128.21, 128.18, 66.55, 45.49, 39.11, 29.82, 24.78, что проводило к соединению (**Vб**) (2.51 г, 67%, считая на **IIIб**) в виде полузакристаллизовавшегося масла, R_f 0.22 (В), $[\alpha]_D^{20}$ +149.6° (*c* 3.0, CH_2Cl_2). ^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$) δ: 8.17–8.10 (1H, м, Ns), 7.88–7.81 (1H, м, Ns), 7.75–7.68 (2H, м, Ns), 7.41–7.29 (5H, м, Ph), 5.20–5.08 (м, 4H, NH-Ns + + NH-Cbz + CH_2Ph), 3.65–3.52 (1H, м, CH), 3.46–3.35 (1H, м, NHC$\underline{H}_2$), 3.29–3.17 (1H, м, NHC$\underline{H}_2$), 1.87–1.71 (1H, м, $NHCH_2C\underline{H}_2$), 1.64–1.49 (1H, м, $NHCH_2C\underline{H}_2$), 1.04 (3H, д, *J* 6.6, CH_3). ^{13}C-ЯМР ($CDCl_3$) δ: 156.60, 148.03, 136.78, 133.72, 133.07, 130.82, 128.67, 128.25 (2C), 125.59, 66.81, 48.82, 37.72, 37.22, 21.73. HRESIMS: *m/z* вычислено для $C_{18}H_{22}N_3O_6S^+$, $[M + H]^+$: 408.1224. Найдено: 408.1220.

(3*R*,10*R*)-*N*^{1},*N*^{12}-*Бис*-(бензилоксикарбонил)-1,12-диамино-3,10-диметил-4,9-диазадодекан (VIa). Суспензию 3.6 г (8.86 ммоль) соединения (**Va**), 3.8 г (27.2 ммоль) K_2CO_3 и 1.18 г (3.81 ммоль) 1,4-дийодбутана в абс. DMF (15 мл) перемешивали в течение 24 ч при 45°C, прибавляли 0.5 мл (4.2 ммоль) BnBr и перемешивали еще 12 ч при 20°C. Затем к реакционной смеси прибавляли 2.0 г (14 ммоль) K_2CO_3 и 2.0 мл (19.2 ммоль) PhSH в DMF (5 мл) и перемешивали 12 ч при 20°C, осадок отделяли центрифугированием, промывали DMF (2 × 15 мл) и объединенные органические вытяжки упаривали в вакууме. Остаток растворяли в CH_2Cl_2 (25 мл), последовательно промывали H_2O (2 × 5 мл), 5M NaCl (2 × 5 мл) и высушивали над K_2CO_3. Растворитель отгоняли в вакууме, остаток очищали колоночной хроматографией на SiO_2 (90 г), элюируя смесью диоксан — 25% NH_4OH (95 : 5). Фракции, содержащие соединение (**VIa**), упаривали в вакууме досуха и остаток высушивали над P_2O_5, что приводило к соединению (**VIa**) (3.18 г, 72%) в виде бесцветного масла. R_f 0.24 (Б), $[\alpha]_D^{20}$ −16.9° (*c* 2.0, CH_2Cl_2). ^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$) 7.41–7.28 (10H, м, 2*Ph), 5.98 (2H, уш.с, 2*NHCbz), 5.09 (4H, с, 2*C$\underline{H}_2$Ph), 3.41–3.15 (4H, м, 2*CbzNHC$\underline{H}_2$), 2.78–2.57 (4H, м, 2*CH + CHC$\underline{H}_2$), 2.55–2.42 (2H, м, CHC$\underline{H}_2$), 1.65–1.39 (10H, м, 2*$NHCH_2CH_2$, 1.05 (6H, д, *J* 6.4, 2*CH_3). ^{13}C-ЯМР ($CDCl_3$) δ: 156.58, 137.07, 128.58, 128.08 (2C), 66.50, 52.29, 47.01, 39.11, 35.85, 28.41, 20.54. HRESIMS: *m/z* вычислено для $C_{28}H_{43}N_4O_4^+$, $[M + H]^+$: 499.3279. Найдено: 499.3274.

(3*S*,10*S*)-*N*^{1},*N*^{12}-*Бис*-(бензилоксикарбонил)-1,12-диамино-3,10-диметил-4,9-диазадодекан (VIб). Получали аналогично соединению (**VIa**), исходя из 2.4 г (5.83 ммоль) соединения (**Vб**) и 0.84 г (2.7 ммоль) 1,4-дийодбутана в абс. DMF, что после очистки при помощи колоночной хроматографии на силикагеле приводило к соединению (**VIб**) (2.03 г, 70%) в виде бесцветного масла. R_f 0.24 (Б), $[\alpha]_D^{20}$ +16.3° (*c* 2.0, CH_2Cl_2). ^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$) 7.40–7.27 (10H, м, 2*Ph), 5.98 (2H, уш.с, 2*NHCbz), 5.09 (4H, с, 2*C$\underline{H}_2$Ph), 3.40–3.15 (4H, м, 2*CbzNHC$\underline{H}_2$), 2.78–2.56 (4H, м, 2*CH + CHC$\underline{H}_2$), 2.55–2.41 (2H, м, CHC$\underline{H}_2$), 1.67–1.38 (10H, м, $NHCH_2CH_2$), 1.05 (6H, д, *J* 6.4, 2*CH_3). ^{13}C-ЯМР ($CDCl_3$) δ: 156.58, 137.08, 128.59, 128.09 (2C), 66.51, 52.31, 47.02, 39.13, 35.85, 28.42, 20.55. HRESIMS: *m/z* вычислено для $C_{28}H_{43}N_4O_4^+$, $[M + H]^+$: 499.3279. Найдено: 499.3275.

Тетрагидрохлорид (3*R*,10*R*)-1,12-диамино-3,10-диметил-4,9-диазадодекана (VIIa). К раствору 2.86 г (5.74 ммоль) соединения (**VIa**) в 35 мл смеси AcOH : MeOH (1 : 1) прибавляли 1 мл суспензии Pd-черни в MeOH и гидрировали при атмосферном давлении до прекращения выделения CO_2. Pd-чернь отфильтровывали, промывали MeOH, объединенные фильтраты упаривали в вакууме досуха. Остаток соупаривали с EtOH (2 × 15 мл), растворяли в 20 мл EtOH, прибавляли 7 мл 5 M HCl и полученный раствор упаривали в вакууме досуха. Остаток соупаривали с EtOH (3 × 15 мл), высушивали в вакууме над P_2O_5 и перекристаллизовывали из смеси MeOH-EtOH, что после высушивания в вакууме над P_2O_5/KOH приводило к целевому соединению (**VIIa**) (1.6 г, 74%) в виде бесцветных кристаллов: т.пл. 242–243°C, R_f 0.16 (Г), $[\alpha]_D^{20}$ +5.9° (*c* 2.0, H_2O). ^{1}H-ЯМР (D_2O) δ: 3.50–3.37 (2H, м, 2*C$\underline{H}$), 3.23–3.03 (8H, м 2*$NH_2C\underline{H}_2$ + + 2*NHC$\underline{H}_2$), 2.26–2.12 (2H, м, 2*CHC$\underline{H}_2$), 2.02–1.86 (2H, м, 2*CHC$\underline{H}_2$), 1.85–1.72 (4H, м, 2*$NHCH_2C\underline{H}_2$), 1.36 (6H, д, *J* 6.6 Hz, 2*CH_3). ^{13}C-ЯМР (D_2O) δ: 52.74, 44.87, 36.56, 30.90, 23.71, 15.79. HRESIMS: *m/z* вычислено для $C_{12}H_{31}N_4^+$, $[M + H]^+$: 231.2543. Найдено: 231.2545.

Тетрагидрохлорид (3*S*,10*S*)-1,12-диамино-3,10-диметил-4,9-диазадодекана (VIIб). Получали аналогично соединению (**VIIa**), исходя из 1.69 г (3.4 ммоль) соединения (**VIб**), что приводило к соединению (**VIIб**)

(0.90 г, 70%) в виде бесцветных кристаллов: т.пл. 240–242°C, R_f 0.16 (Г), $[\alpha]_D^{20}$ –6.3° (*c* 2.0, H_2O). ^{1}H-ЯМР (D_2O) δ: 3.51–3.36 (2H, м, 2*C<u>H</u>), 3.23–3.03 (8H, м 2*$NH_2C\underline{H}_2$ + 2*$NHC\underline{H}_2$), 2.26–2.12 (2H, м, $CHC\underline{H}_2$), 2.02–1.87 (2H, м, 2*$CHC\underline{H}_2$), 1.85–1.72 (4H, м, 2*$NHCH_2C\underline{H}_2$), 1.36 (6H, д, *J* 6.6 Hz, 2*CH_3). ^{13}C-ЯМР (D_2O) δ: 52.72, 44.88, 36.55, 30.88, 23.71, 15.75. HRESIMS: *m/z* вычислено для $C_{12}H_{31}N_4^+$, $[M + H]^+$: 231.2543. Найдено: 231.2542.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Синтез соединений выполнен при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 17-74-20049), физико-химические исследования – Российским Фондом Фундаментальных Исследований (грант № 18-54-11008) и Академией Финляндии (грант № 315487).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Miller-Fleming L., Olin-Sandoval V., Campbell K., Ralser M.* // J. Mol. Biol. 2015. V. 427. P. 3389–3406. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.020
2. *Pegg A.E.* // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 14904–14912. https://doi.org/10.1074/jbc.R116.731661
3. *Ramani D., De Bandt J.P., Cynober L.* // Clin. Nut. 2014. V. 33. P. 14–22. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.09.019
4. *Inoue1 K., Tsutsui H., Akatsu H., Hashizume Y., Matsukawa N., Yamamoto T., Toyo'oka T.* // Sci. Rep. 2013. V. 3. P. 2364. https://doi.org/10.1038/srep02364
5. *Alhonen L., Parkkinen J.J., Keinanen T., Sinervirta R., Herzig K.H., Janne J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 8290–8295. https://doi.org/10.1073/pnas.140122097
6. *Eisenberg T., Abdellatif M., Schoeder S., Primessnig U., Stekovic S., Pendl T., Harger A., Schipke J., Zimmermann A., Schmidt A., Tong M., Ruckenstuhl Ch., Dammbrueck Ch., Gross A.S., Herbst V., Magnes Ch., Trausinger G., Narath S., Meinitzer A., Hu Z., Kirsch A., Eller K., Carmona-Gutierrez D., Büttner S., Pietrocola F., Knittelfelder O., Schrepfer E., Rockenfeller P., Simonini C., Rahn A., Horsch M., Moreth K., Beckers J., Fuchs H., Gailus-Durner V., Neff F., Janik D., Rathkolb B., Rozman J., Hrabe de Angelis M., Moustafa T., Haemmerle G., Mayr M., Willeit P., von Frieling-Salewsky M., Pieske B., Scorrano L., Pieber T., Pechlaner R., Willeit J., Sigrist S.J., Linke W.A., Mühlfeld Ch., Sadoshima J., Dengjel J., Kiechl S., Kroemer G., Sedej S., Madeo F.* // Nature Med. 2016. V. 22. P. 1428–1438. https://doi.org/10.1038/nm.4222
7. *Lewandowski N.M., Ju S., Verbitsky M., Ross B., Geddie M.L., Rockenstein E., Adame A., Muhammad A., Vonsattel J.P., Ringe D., Cote L., Lindquist S., Masliah E., Petsko G.A., Marder K., Clark L.N., Small S.A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 16970–16975. https://doi.org/10.1073/pnas.1011751107
8. *Igarashi K., Kashiwagi K.* // Mol. Nutr. Food Res. 2011. V. 55. P. 1332–1341. https://doi.org/10.1002/mnfr.201100068
9. *Casero R.A., Murray Stewart T., Pegg A.E.* // Nature Rev. Cancer. 2018. V. 18. P. 681–695. https://doi.org/10.1038/s41568-018-0050-3
10. *Gerner E.W., Bruckheimer E., Cohen A.* // J. Biol. Chem. 2018. V. 293. P. 18770–18778. https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003343
11. *Cason A.L., Ikeguchi Y., Skinner C., Wood T.C., Lubs H.A., Martinez F., Simensen R.J., Stevenson R.E., Pegg A.E., Schwartz C.E.* // Eur. J. Hum. Genet. 2003. V. 11. P. 937–944. https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201072
12. *Murray-Stewart T., Dunworth M., Foley J.R., Schwartz C.E., Casero R.A.* // Med. Sci. (Basel). 2018. V. 6. P. E112. https://doi.org/10.3390/medsci6040112
13. *Hyvonen M.T., Keinanen T.A., Cerrada-Gimenez M., Sinervirta R., Grigorenko N., Khomutov A.R., Vepsalainen J., Alhonen L., Janne J.* // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 34700–34706. https://doi.org/10.1074/jbc.M704282200
14. *Murray Stewart T., Khomutov M., Foley J.R., Guo X., Holbert C.E., Dunston T.T., Schwartz C.E., Gabrielson K., Khomutov A., Casero R.A.* // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. P. 3247–3256. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011572
15. *Grigorenko N.A., Khomutov A.R., Keinänen T.A., Järvinen A., Alhonen L., Jänne J., Vepsäläinen J.* // Tetrahedron. 2007. V. 63. P. 2257–2262. https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.12.065
16. *Khomutov M., Hyvönen M.T., Simonian A., Formanovsky A.A., Mikhura I.V., Chizhov A.O., Kochetkov S.N., Alhonen L., Vepsäläinen J., Keinänen T.A., Khomutov A.R.* // J. Med. Chem. 2019. V. 62. P. 11335–11347. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01666
17. *Хомутов М.А., Михура И.В., Кочетков С.Н., Хомутов А.Р.* // Биоорган. химия. 2019. Т. 45. С. 588–614. [*Khomutov M.A., Mikhura I.V., Kochetkov S.N., Khomutov A.R.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 463–487.] https://doi.org/10.1134/S013234231906023X
18. *Lebreton L., Jost E., Carboni B., Annat J., Vaultier M., Dutartre P., Renaut P.* // J. Med. Chem. 1999. V. 42. P. 4749–4763. https://doi.org/10.1021/jm991043x
19. *Tsedilin A.M., Fakhrutdinov A.N., Eremin D.B., Zalesskiy S.S., Chizhov A.O., Kolotyrkina N. G., Ananikov V. P.* // Mend. Commun. 2015. V. 25. P. 454–456. https://doi.org/10.1016/j.mencom.2015.11.019

Synthesis of (3*R*,10*R*)- and (3*S*,10*S*)-Diastereomers of 3,10-Dimethylspermine

M. A. Khomutov*, M. T. Hyvönen, A. I. Salikhov*, A. O. Chizhov***, I. Ryzhov****, S. N. Kochetkov*, J. Vepsäläinen**, T. A. Keinänen**, and A. R. Khomutov*, #**

#Phone: +7 (499) 135-60-65; e-mail: alexkhom@list.ru

**Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia*

***School of Pharmacy, Biocenter Kuopio, University of Eastern Finland, P.O. Box 1627 Kuopio, 70211 Finland*

****Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 47, Moscow, 119991 Russia*

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

A simple and practical 10-step synthesis is reported for previously unknown diastereomers of *C*-methylated spermine (Spm) analogue, 1,12-diamino-3,10-dimethyl-4,9-diazadodecane (3,10-Me_2Spm) starting from commercially available enantiomers of 2-(Boc-amino)-1-propanol. Title compounds were prepared in gram scale, in excellent overall yields and enantiomeric purity. Since biochemical properties of 3,10-Me_2Spm can be regulated by changing the configuration of chiral center(s), these analogues are of obvious value for studying not only cellular functions of spermine, but even diseases associated with the disturbances of spermine metabolism.

Keywords: polyamines, spermine analogs, (3R,10R)- and (3S,10S)-3,10-Me_2Spm, spermine oxidase, acetylpolyamine oxidase

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 693–700

УДК 547.853.3:576.08:615.244

"СДВОЕННЫЕ" ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРИМИДИНА: СИНТЕЗ И ПЕРВИЧНАЯ ОЦЕНКА ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ *in vitro*

© 2020 г. А. Б. Выштакалюк*,#, В. Э. Семенов*,#, А. А. Парфенов*, М. С. Шашин*, Г. П. Беляев*, И. В. Галяметдинова*, В. В. Зобов*

**Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, Россия, 420088 Казань, ул. Арбузова, 8*

Поступила в редакцию 09.04.2020 г.
После доработки 19.04.2020 г.
Принята к публикации 24.04.2020 г.

Разработан синтез "сдвоенных" производных лекарственного препарата Ксимедон (1,2-дигидро-4,6-диметил-1-N-(2-гидроксиэтил)пиримидона-2), далее пиримидин (**I**), в которых молекулы пиримидина (**I**) соединены алкил(ксилиленил)дионатным мостиком. На клеточной линии нормальных гепатоцитов человека *Chang Liver* получены первичные данные по гепатопротекторной активности пяти "сдвоенных" производных пиримидина (**I**) с различным числом метиленовых групп и *мета*-ксилиленовым фрагментом в сложноэфирном мостике. Определены цитотоксичность, цитопротекторные свойства новых соединений на фоне воздействия *d*-галактозамина в концентрации 150 ммоль/л и изучено их влияние на клеточный цикл в сравнении с исходным пиримидином **I**, установлена зависимость биологических свойств изучаемых производных от их структуры.

Ключевые слова: пиримидины, Ксимедон, гепатопротекторы, клеточный цикл, цитотоксичность

DOI: 10.31857/S0132342320060366

ВВЕДЕНИЕ

Восстановление и регенерация органов, в том числе печени, является значимой проблемой. Печень – уникальный орган в своей способности восстанавливаться после повреждений. Однако печень постоянно подвержена значительным пагубным влияниям различного характера (от механических повреждений, до интоксикаций). Примерами поражений печени являются неалкогольный стеатоз, гепатиты, цирроз и гепатоцеллюлярный рак (третья по значимости причина смертности от рака в мире [1]). Поэтому поиск новых потенциальных гепатопротекторов способных ускорить восстановление печени является важной задачей.

Ксимедон (1,2-дигидро-4,6-диметил-1-N-(2-гидроксиэтил)пиримидона-2) соединение (**I**) – лекарственный препарат широкого спектра действия, обладающий высоким регенеративным потенциалом [2]. Было показано влияние пиримидинов на посттравматическую регенерацию миелиновых волокон [3] и восстановление периферических аксонов сенсорных нейронов [4]. Кроме того, производные пиримидинов улучшают регенерацию печени и ослабляют фиброгенез ткани печени [5]. Поэтому не угасает интерес к синтезу новых производных пиримидина (**I**), которые бы улучшили его свойства. В предыдущих наших исследованиях для некоторых производных пиримидина (**I**) также были показаны гепатопротекторный, антиоксидантный и нейропротекторные эффекты [6–8].

Целью настоящего исследования являлись синтез новых производных Ксимедона, представляющих собой "сдвоенные" молекулы пиримидина (**I**), в которых два 1,2-дигидро-4,6-диметил-1-*N*-(2-этокси)пиримид-2-оновых фрагмента молекулы Ксимедона связаны друг с другом дикарбоксоалкильным или дикарбоксоксилиленовым мостиком, проведение первичной оценки *in vitro* их гепатопротекторных свойств и установление зависимости структура-активность.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

"Сдвоенные" соединения (**IIa–e**) получали взаимодействием Ксимедона (**I**) с соответствующим дихлорангидридом (**III**). Выходы целевых соединений невелики из-за потерь, связанных с проблемой отделения продукта реакции от образующегося в ходе ее гидрохлорида триэтиламина. Соединения (**IIa–e**) также как и исходный (**I**)

Сокращения: *d*-ГЛА – *d*-галактозамин; IC_{50} – концентрация вещества, вызывающая гибель 50% клеток; фазы клеточного цикла: G0/G1 – фаза покоя/пресинтетическая; S – синтетическая; G2/M – постсинтетическая/митотическая.

\# Автор для связи: (тел.: +7 (917) 229-34-85; эл. адрес: alex.vysh@mail.ru; тел.: +7(905)317-71-41; эл. адрес: sve@iopc.ru).

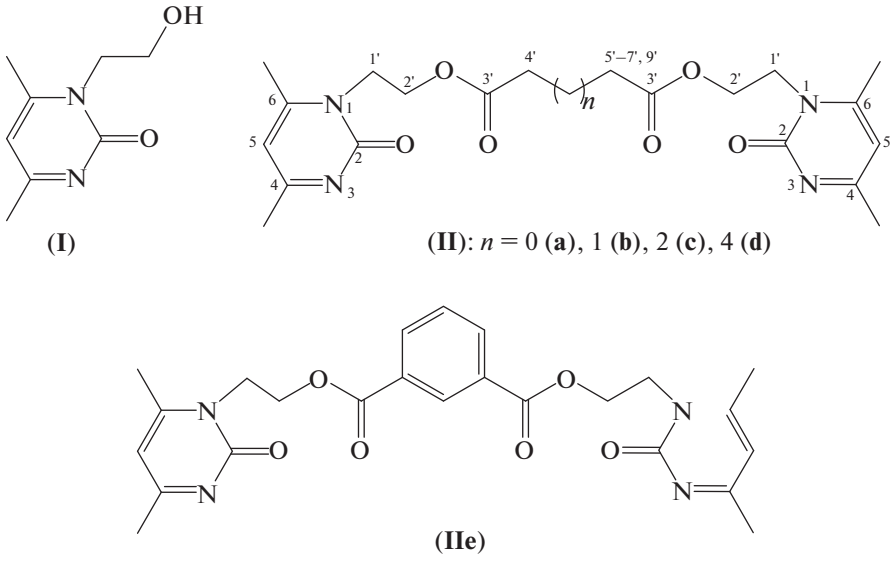


Рис. 1. Структуры Ксимедона (**I**) и его "сдвоенных производных" (**IIa**–**e**). Указана нумерация пиримидинового кольца и алкильного фрагмента при атоме N пиримидинового кольца.

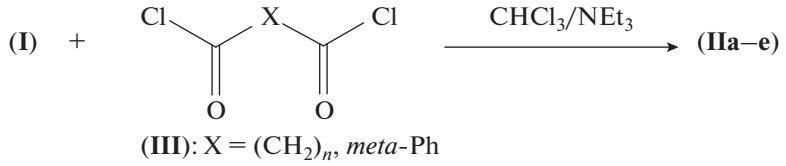


Рис. 2. Схема синтеза "сдвоенных" молекул Ксимедона – соединений (**IIa**–**e**).

растворимы в воде, что делает возможным определение их гепатопротекторной активности.

Новые производные Ксимедона содержат различное число метиленовых групп, а также ксилиленовый фрагмент в составе сложноэфирного мостика между пиримидиновыми кольцами. Структурные формулы Ксимедона – 1,2-дигидро-4,6-диметил-1-*N*-(2-гидроксиэтил)пиримид-2-она (соединение (**I**)), а также его "сдвоенных" производных (соединения (**IIa**–**e**)), в которых молекулы Ксимедона соединены алкил(*мета*-ксилилен)дионатным мостиком, приведены на рис. 1. Схема синтеза "сдвоенных" молекул Ксимедона – соединений (**IIa**–**e**) приведена на рис. 2.

Первичную оценку гепатопротекторных свойств новых синтезированных соединений – производных пиримидина (**I**) проводили *in vitro*, в соответствии с [9], на клеточной линии нормальных гепатоцитов человека *Chang Liver*.

Результаты оценки цитотоксичности синтезированных соединений приведены в табл. 1. Из приведенных результатов следует, что цитотоксичность Ксимедона для *Chang Liver* не установлена, и проявляется при концентрациях вещества более 200 ммоль/л, в больших концентрациях исследование не проводилось. При этом следует отметить, что в исследованном диапазоне концентраций пиримидина (**I**) (от 3.1 мкмоль/л до 200 ммоль/л) количество живых клеток достоверно не отличалось от референсной интактной выборки. Лишь при 200 ммоль/л наблюдалось незначительное уменьшение количества живых клеток (93.7 ± 0.67% против интактной выборки 98.2 ± 0.38%), при остальных исследованных концентрациях пиримидина (**I**) количество живых клеток не отличалось от интактной группы. То есть, препарат (**I**) не токсичен для клеток печени.

Из вновь синтезированных соединений наименьшую цитотоксичность по отношению к гепатоцитам человека линии *Chang Liver* проявили соединения (**IIa**) и (**IIe**) с сукцинатным и изофталатным мостиком между фрагментами Ксимедона соответственно (табл. 1), и адипинат (**IIc**). Концентрация IC_{50}, приводящая к гибели 50% клеток, для сукцината (**IIa**) не установлена. Показано, что IC_{50} для (**IIa**) превышает значение 8 ммоль/л, предельной концентрацией сукцината в водном растворе. Ввиду ограниченной растворимости в воде, данное соединение не было исследовано в больших концентрациях. Для изофталата (**IIe**) IC_{50} составила в

Таблица 1. Цитотоксичность “сдвоенных” пиримидинов для клеток нормальных гепатоцитов человека *Chang Liver*

Соединение	Средняя концентрация IC_{50}, мМ	Доверительный интервал IC_{50}, мМ
(I)	>200.0	–
(IIa)	>8.0	–
(IIb)	1.8	1.0–2.5
(IIc)	6.6	6.4–6.8
(IId)	2.7	2.5–2.9
(IIe)	13.8	10.0–17.5

Таблица 2. Количество жизнеспособных клеток (средние ± стандартная ошибка) при различных концентрациях исследуемых соединений на фоне токсического воздействия *d*-ГЛА в сравнении с контролем *d*-ГЛА

Концентрация, мкмоль/л	**(I)**	**(IIa)**	**(IIb)**	**(IIc)**	**(IId)**	**(IIe)**
3.5	2.2 ± 0.5	–	–	–	–	–
6.25	–	3.9 ± 0.10	–	3.5 ± 0.5	2.7 ± 0.40	–
17.5	2.7 ± 0.9	2.3 ± 0.92	–	4.5 ± 0.01	3.3 ± 1.4	–
25	–	**4.0 ± 0.98***	–	–	**13.2 ± 7.3***	–
35	**31.0 ± 6.6***	–	–	–	–	–
50	–	**6.1 ± 0.85***	–	–	–	–
62.5	–	15.6 ± 3.3	–	**39.3 ± 4.6***	**22.5 ± 9.8***	–
125	**48.2 ± 5.2***	11.6 ± 1.4	–	**42.1 ± 2.7***	13.9 ± 8.9	–
250	**56.3 ± 7.1***	–	**8.11 ± 5.7***	**22.9 ± 7.7***	3.2 ± 3.3	5.4 ± 0.8
500	**52.7 ± 4.4***	17.5 ± 2.1	22.7 ± 2.4	2.1 ± 0.5	0.0 ± 0.0*	18.3 ± 2.2
1000	–	–	18.0 ± 2.9	–	–	16.5 ± 1.9
Контроль *d*-ГЛА	1.4 ± 0.4[1]	1.8 ± 0.7[1]	5.2 ± 0.3[1]	1.8 ± 0.7[1]	1.8 ± 0.7[1]	5.2 ± 0.3[1]
	6.7 ± 4.2[2]	16.2 ± 3.3[2]	18.1 ± 1.5[2]	6.7 ± 4.2[2]	6.7 ± 4.2[2]	18.1 ± 1.5[2]
Интактные клетки	47.5 ± 1.1[1]	88.5 ± 1.5[1]	98.5 ± 0.3[1]	88.5 ± 1.5[1]	88.5 ± 1.5[1]	98.5 ± 0.3[1]
	90.9 ± 3.6[2]	97.0 ± 0.3[2]	95.6 ± 0.4[2]	90.9 ± 3.6[2]	90.9 ± 3.6[2]	95.6 ± 0.4[2]

* – различия с соответствующим контролем *d*-ГЛА статистически достоверны при $p < 0.05$ (тест Манн–Уитни); жирным шрифтом выделены значения, демонстрирующие положительный эффект веществ.
[1] показатели контрольной группы *d*-ГЛА и интактной группы клеток без воздействия для низких концентраций веществ: для **(I)**, **(IIa)**, **(IIc)**, **(IId)** в диапазоне от 3.5 до 50 мкмоль/л, для **IIb**, **IIe** – 250 мкмоль/л.
[2] показатели контрольной группы *d*-ГЛА и интактной группы клеток без воздействия для высоких концентраций веществ: для **(I)**, **(IIa)**, **(IIc)**, **(IId)** в диапазоне от 62.5 до 500 мкмоль/л, для **(IIb)**, **(IIe)** – 500–1000 мкмоль/л.

среднем 13.8 ммоль/л, для адипината **(IIc)** – 6.6 ммоль/л. Глутарат **(IIb)** и суберат **(IId)** оказались наиболее токсичными для гепатоцитов, их IC_{50} составила в среднем 1.8 и 2.7 ммоль/л соответственно (табл. 1).

Результаты оценки цитопротекторных свойств синтезированных соединений при различных концентрациях на фоне токсического воздействия *d*-ГЛА (концентрация 150 ммоль/л) приведены в табл. 2, график зависимости жизнеспособности клеток от концентрации веществ – на рис. 3.

Из данных табл. 2 следует, что в низких концентрациях Ксимедон **(I)** проявляет тенденцию к повышению количества живых клеток относительно контроля *d*-ГЛА. Статистически достоверный протекторный эффект пиримидин **(I)** проявил в диапазоне концентраций от 35 до 500 мкмоль/л. Максимальный эффект пиримидина **I**, приводящий к увеличению количества живых клеток в 8.4 раза, наблюдался при концентрации 250 мкмоль/л (табл. 2, рис. 3).

Среди “сдвоенных” производных Ксимедона наименьший протекторный эффект проявили соединения **(IIb)** и **(IIe)** (табл. 2, рис. 3), причем изофталат **(IIe)** не оказал какого-либо эффекта, а глутарат **(IIb)** в условиях токсического воздействия *d*-ГЛА оказал протекторный эффект лишь в концентрации 250 мкмоль/л, приводя к увеличению количества живых клеток на 56% по отношению к контролю *d*-ГЛА.

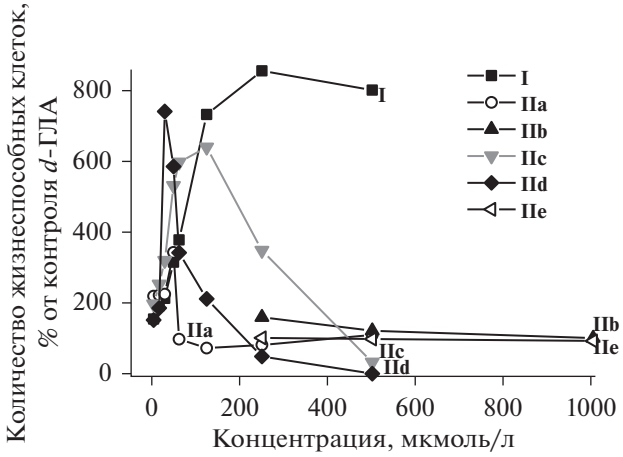


Рис. 3. Зависимость цитопротекторной активности (жизнеспособности клеток *Chang Liver* на фоне токсического воздействия *d*-ГЛА) исследуемых соединений от концентрации.

Адипинат (**IIc**) среди новых производных Ксимедона оказался наиболее эффективным в качестве гепатопротектора, т.к. под его влиянием (концентрация 125 мкмоль/л) увеличилось количество живых клеток в 6.3 раза по сравнению с контролем *d*-ГЛА (табл. 2, рис. 3). Однако, данное соединение проявило чуть меньший эффект по сравнению с аналогичной концентрацией пиримидина (**I**), приводящего к повышению количества живых клеток в тех же условиях в 7.2 раза. Менее выраженный гепатопротекторный эффект проявили соединения (**IIa**) и (**IId**), приводя к повышению количества живых клеток в условиях воздействия *d*-ГЛА при концентрации 25 мкмоль/л в 2.2 и 7.3 раз соответственно. Сукцинат (**IIa**) в концентрации 50 мкмоль/л и суберат (**IId**) в концентрации 62.5 мкмоль/л повышают количество живых клеток в 3.4 раза (табл. 2, рис. 3). В больших концентрациях сукцинат (**IIa**) и суберат (**IId**) не проявили цитопротеторного эффекта, что может быть связано с ингибирующим действием самих веществ.

Результаты исследования клеточного цикла, представленные на рис. 4 и 5, показали, что пиримидин (**I**) оказало эффект через 24 часа инкубации, приводя к достоверному увеличению количества клеток в фазе покоя/пресинтетическая фаза (G0/G1) и уменьшению количества клеток в синтетической фазе S и в фазе постсинтетическая/митотическая (G2/M) (рис. 4*а*). Через 72 часа, наоборот, наблюдали уменьшение количества клеток в фазе G0/G1 и увеличение количества клеток в фазе S, что свидетельствует о стимуляции репликации ДНК (рис. 4*б*). Количество клеток в фазе G2/M через 72 часа инкубации не отличалось от контрольных интактных клеток.

Результаты исследования влияния вновь синтезированных соединений на клеточный цикл показали, что сукцинат (**IIa**) вызывает увеличение количества клеток в фазе G0/G1 в высоких концентрациях 50 и 100 мкмоль/л через 24 часа инкубации и в низкой концентрации 3.125 мкмоль/л через 48 часов инкубации (рис. 5*а*, 5*б*). При этом увеличение количества клеток в фазе G0/G1 через 72 часа сопровождалось достоверным снижением количества клеток в фазе S при концентрации сукцината (**IIa**) 3.125 мкмоль/л. В свою очередь адипинат (**IIc**) не действует на клеточный цикл (рис. 5*в*, 5*г*). Суберат (**IId**) не оказал влияния на клеточный цикл через 24 часа (рис. 5*д*). Через

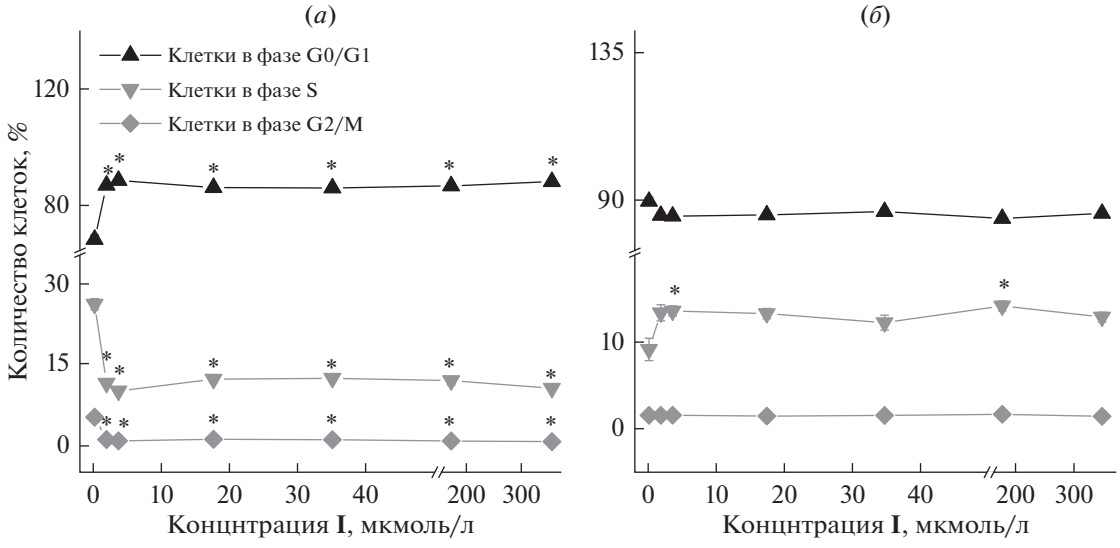


Рис. 4. Зависимость количества клеток в определенных фазах клеточного цикла от концентрации соединения (**I**) через 24 (*а*) и 72 (*б*) часа инкубации. * – различия с интактными клетками (на графике – концентрация 0 мкмоль/л) статистически достоверное при $p < 0.05$ (тест Манн–Уитни).

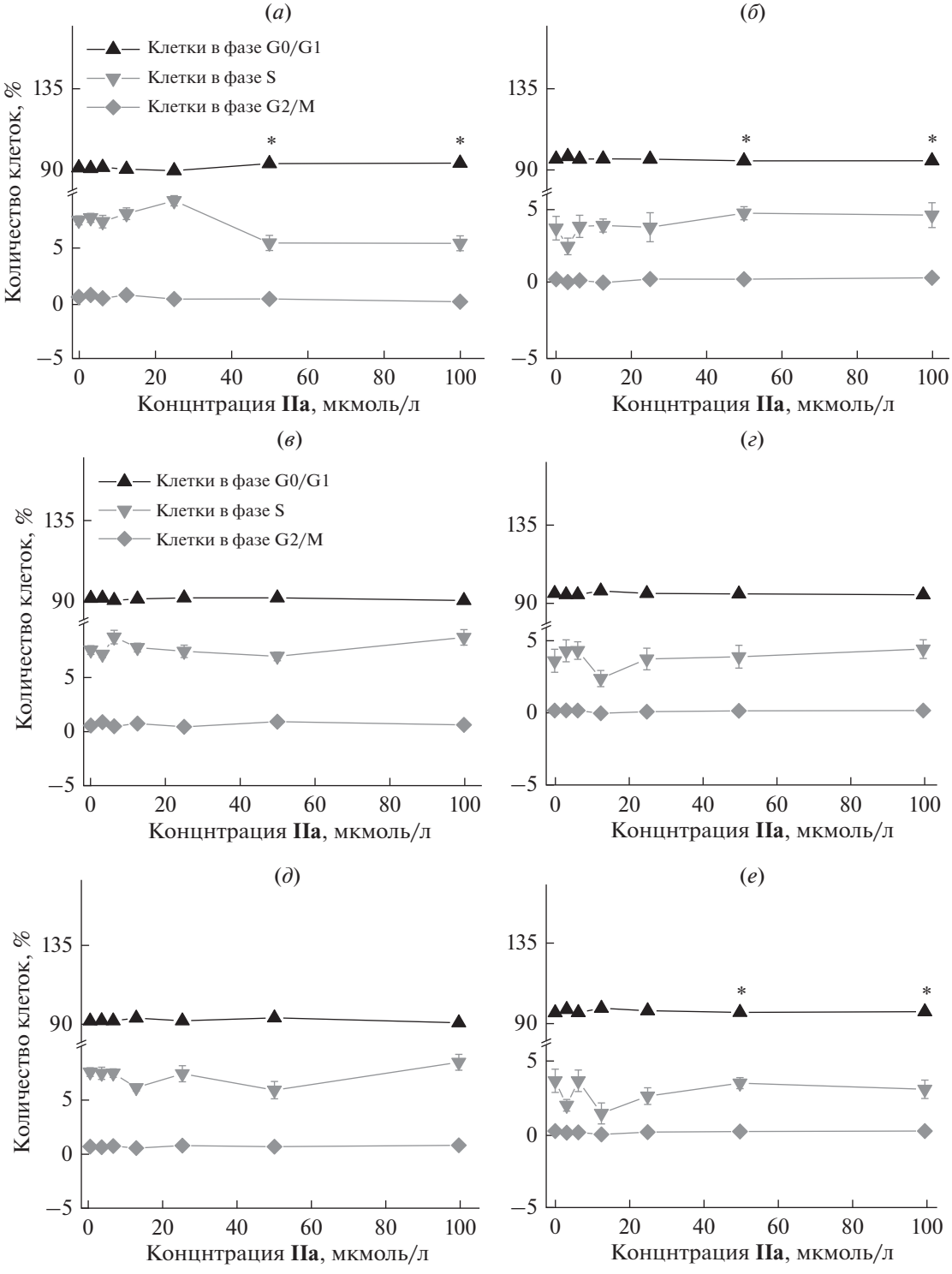


Рис. 5. Зависимость количества клеток в определенных фазах клеточного цикла от концентрации соединения (**IIa**), **(IIc)** и **(IId)** через 24 часа (*а*, *в*, *д* соответственно) и 48 часов инкубации (*б*, *г*, *е* соответственно). * – различия с интактными клетками (на графике – концентрация 0 мкмоль/л) статистически достоверное при $p < 0.05$ (тест Манн–Уитни).

48 часов наблюдали увеличение количества клеток в фазе G0/G1 и уменьшение в фазе S при его добавлении в ростовую среду в концентрации 12.5 мкмоль/л (рис. 5*е*).

Результаты проведенных исследований показали, что лекарственный препарат на основе производного пиримидина Ксимедон (соединение **I**) проявляет отсутствие цитотоксичности и выра-

женные цитопротекторные свойства в условиях токсического воздействия *d*-галактозамина по отношению к гепатоцитам человека клеточной линии *Chang Liver*. На поздней стадии инкубации клеток (72 часа) Ксимедон оказывает стимулирующее влияние на репликацию ДНК, увеличивая количество клеток в синтетической фазе клеточного цикла. “Сдваивание” молекул Ксимедона посредством алкил(ксилиленил)дионатного мостика привело к повышению токсичности и менее выраженным гепатопротекторным свойствам по сравнению с исходным препаратом (**I**). Среди новых производных наибольший гепатопротекторный эффект, сопоставимый с Ксимедоном, проявило соединение (**IIc**), с адипинатным мостиком между фрагментами Ксимедона, в концентрации 125 мкмоль/л. Учитывая, что механизмом токсического влияния *d*-галактозамина является нарушение синтеза белка, следует предположить, что гепатопротекторный эффект Ксимедона и его производных связан с восстановлением белоксинтетической функции гепатоцитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР ^{1}H, ^{13}C регистрировали на спектрометре Avance-400 (Bruker, Германия) с рабочими частотами 400 МГц (^{1}H) и 100.6 МГц (^{13}C), калибровали по использованному растворителю ($CDCl_3$ и DMSO-d_6, 7.26, 2.50 в спектрах ^{1}H, и 77.0, 44.0 в спектрах ^{13}C соответственно). ИК-спектры соединений (ν_{max}, см$^{-1}$) записаны в тонком слое или в таблетках с KBr на Фурье-спектрометре Vector 22 (Bruker) при стандартных условиях в диапазоне 4000–400 см$^{-1}$ при разрешении 4 см$^{-1}$. Масс-спектры матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF) получали на масс-спектрометре UltraFlex III фирмы Bruker. Матрица – *n*-нитроанилин. Элементный анализ проводили на C,H,N-анализаторе EuroVector.

1,2-Дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)пиримидон-2 (Ксимедон, (**I**)) синтезировали, исходя из 1,2-дигидро-4,6-диметилпиримидона-2 и 2-хлорэтанола по известной методике [10]. Сукцинилдихлорид, глутарилдихлорид, адипинилдихлорид, изофталилдихлорид (Acros Organics) и суберилдихлорид (Sigma) использовали продажные.

Общая методика получения соединений (IIa–e). К раствору 5.90 г (35.0 ммоль) Ксимедона (**I**) в 250 мл хлороформа добавляли 3.60 г (35.6 ммоль) триэтиламина, и в течение 1 ч и перемешивании прикапывали раствор 72.0 ммоль дихлорангидрида в 50 мл хлороформа. Реакционную массу перемешивали при 50–55°C в течение 10 ч. По охлаждении до комнатной температуры реакционную смесь концентрировали до 20–25 мл и хроматографировали на колонке с нейтральной Al_2O_3, активность II. Колонку последовательно элюировали петролейным эфиром, этилацетатом, смесью растворителей этилацетат–метанол (20 : 1) и этилацетат–метанол (4 : 1). Из фракций смеси растворителей этилацетат–метанол (4 : 1) получали смесь целевых соединений (**IIa–e**) с гидрохлоридом триэтиламина, которую растворяли в 150 мл хлороформа и промывали водой (3 × 200 мл). Органический слой отделяли и сушили над $MgSO_4$, отфильтровывали, растворитель отгоняли, и получали целевые соединения (**IIa–e**).

1,4-Бис[2-(1,2-дигидро-4,6-диметил-2-оксопиримидин-1-*ил*)этил]бутан-дионат (сукцинат) (IIa). Выход соединения (**IIa**) 2.50 г (34%), красные кристаллы, т. пл. 143–144°C. ИК-спектр: 3052, 2961, 1736, 1649, 1608, 1541, 1305, 1151, 1042, 1025, 931, 796. ЯМР ^{1}H: 6.10 (с, 1H, H5), 4.40–4.36 (м, 4H, H2'), 4.24–4.20 (м, 4H, H1'), 3.13–3.05 (м, 4H, H4', H5'), 2.39 (с, 6H, H6), 2.33 (с, 6H, H4). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$): 175.0 (C3'), 172.3 (C4), 157.4 (C6), 155.7 (C2), 105.9 (C5), 60.7 (C2'), 45.9 (C1'), 35.0 (C4', C5'), 25.0 (C4C), 24.4 (C6C). Масс-спектр MALDI-TOF, *m/z*: 418.8 $[M + H]^+$, 440.8 $[M + Na]^+$, 456.8 $[M + K]^+$; вычислено для $C_{20}H_{26}N_4O_6$ 419.2, 441.2, 457.2. Найдено, %: C, 57.52; H, 6.19; N, 13.43. $C_{20}H_{26}N_4O_6$. Вычислено, %: C, 57.41; H, 6.26; N, 13.39.

1,5-Бис[2-(1,2-дигидро-4,6-диметил-2-оксопиримидин-1-*ил*)этил]пентан-дионат (глутарат) (IIb). Выход соединения (**IIb**) 2.27 г (30%), красное масло. ИК-спектр: 2971, 1737, 1656, 1610, 1543, 1253, 934, 796. ЯМР ^{1}H ($CDCl_3$): 6.08 (с, 1H, H5), 4.45–4.41 (м, 4H, H2'), 4.33–4.30 (м, 4H, H1'), 2.37 (с, 6H, H6), 2.30 (с, 6H, H4), 2.29–2.26 (м, 4H, H4', H6'), 1.72–1.69 (м, 2H, H5'). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$): 174.1 (C3'), 174.0 (C4), 157.3 (C6), 155.2 (C2), 105.7 (C5), 61.57 (C2'), 46.2 (C1'), 33.3 (C4', C6'), 24.9 (C4C), 24.1 (C6C), 20.8 (C5'). Масс-спектр MALDI-TOF, *m/z*: 433.3 $[M + H]^+$, 455.2 [M + Na], 471.2 [M + K]; вычислено для $C_{21}H_{28}N_4O_6$ 433.2, 455.2, 471.2. Найдено, %: C, 58.22; H, 6.69; N, 12.93. $C_{21}H_{28}N_4O_6$. Вычислено, %: C, 58.32; H, 6.53; N, 12.96.

1,6-Бис[2-(1,2-дигидро-4,6-диметил-2-оксопиримидин-1-*ил*)этил]гексан-дионат (адипинат) (IIc). Выход соединения (**IIc**) 2.70 г (35%), красное масло. ИК-спектр: 2970, 1736, 1654, 1606, 1543, 1176, 1040, 941, 795. ЯМР ^{1}H ($CDCl_3$): 6.06 (с, 1H, H5), 4.40–4.35 (м, 4H, H2'), 4.22–4.17 (м, 4H, H1'), 2.37 (с, 6H, H6), 2.30 (с, 6H, H4), 2.26–2.23 (м, 4H, H4', H9'), 1.59–1.56 (м, 4H, H5', H6'). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$): 174.8 (C3'), 173.0 (C4), 157.1 (C6), 155.1 (C2), 105.8 (C5), 61.5 (C2'), 46.0 (C1'), 33.6 (C4', C7'), 24.9 (C4C), 24.4 (C5', C6'), 24.0 (C6C). Масс-спектр MALDI-TOF, *m/z*: 447.2 $[M + H]^+$, 469.2 [M + Na]; вычислено для $C_{22}H_{30}N_4O_6$ 447.2, 469.2. Найдено, %: C, 59.22; H, 6.89; N, 12.43. $C_{22}H_{30}N_4O_6$. Вычислено, %: C, 59.18; H, 6.77; N, 12.55.

1,8-Бис[2-(1,2-дигидро-4,6-диметил-2-оксопиримидин-1-*ил*)этил]октан-дионат (суберат) (IId). Выход соединения (**IId**) 3.75 г (47%), красные кристаллы, т. пл. 105–106°C. ИК-спектр: 2978, 1737, 1656, 1608, 1543, 1172, 1037, 939, 796. ЯМР ^{1}H: 6.09 (с, 1H, H5), 4.41–4.37 (м, 4H, H2'), 4.25–4.21 (м, 4H, H1'), 2.39 (с, 6H, H6), 2.32 (с, 6H, H4), 2.28–2.25 (м, 4H, H4', H9'), 1.60–1.50 (м, 4H, H5', H8'), 1.26–1.21 (м, 4H, H6', H7'). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$): 175.2 (C3'), 173.1 (C4), 156.9 (C6), 156.0 (C2), 106.2 (C5), 61.2 (C2'), 45.9 (C1'), 33.6 (C4', C9'), 28.6 (C5', C8'), 25.1 (C4C), 24.4 (C6C), 20.3 (C6', C7'). Масс-спектр MALDI-TOF, *m/z*: 475.0 $[M + H]^+$, 497.0 [M + Na], 512.9 [M + Na]; вычислено для $C_{24}H_{34}N_4O_6$ 475.3, 497.2, 513.2. Найдено, %: C, 60.82; H, 7.29; N, 11.73. $C_{24}H_{34}N_4O_6$. Вычислено, %: C, 60.74; H, 7.22; N, 11.81.

1,3-Бис[2-(1,2-дигидро-4,6-диметил-2-оксопиримидин-1-*ил*)этил]бенз-диоат (изофталат) (IIe). Выход соединения (**IIe**) 2.85 г (35%), желтые кристаллы, т. пл. 63–65°C. ИК-спектр: 3050, 2970, 1736, 1656, 1609, 1542, 1346, 1167, 1042, 1028, 938, 795. ЯМР ^{1}H (DMSO-d_6): 8.13 (с, 1H, HAr), 8.05–8.02 (м, 2H, HAr), 7.54–7.51 (м, 1H, HAr), 6.43 (с, 1H, H5), 4.47–4.40 (м, 8H, H2', H1'), 2.41 (с, 6H, H6), 2.27 (с, 6H, H4). ЯМР ^{13}C (DMSO-d_6): 171.8 (C3'), 162.3 (C4), 156.2 (C6), 154.0 (C2), 129.8, 125.8, 124.5 (CAr), 105.0 (C5), 58.2 (C2'), 40.3 (C1'), 19.2 (C4C), 15.4 (C6C). Масс-спектр MALDI-TOF, *m/z*: 467.2 $[M + H]^+$, 480.2 $[M + Na]^+$, 505.1 $[M + K]^+$; вычислено для $C_{24}H_{26}N_4O_6$ 467.2, 480.2, 505.1. Найдено, %: C, 61.77; H, 5.52; N, 12.11. $C_{24}H_{26}N_4O_6$. Вычислено, %: C, 61.72; H, 5.62; N, 12.01.

Определение цитотоксичности и цитопротекторных свойств *in vitro*. Эксперименты проводили на клеточной линии нормальных гепатоцитов человека *Chang Liver*, полученных из коллекции клеточных культур НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. Культивирование клеток осуществляли в среде ИГЛА-МЕМ с добавлением 10% бычьей сыворотки FBS, 1% незаменимых аминокислот и антибиотика гентамицина (Freshney, 2016).

Клетки открепляли от флакона смесью трипсина и версена в соотношении 1 : 3 и готовили клеточную суспензию с концентрацией 10^5 клеток на мл, раскапывали по 200 мкл суспензии в 96-ти луночный планшет и инкубировали 24 часа. Для исследования цитотоксичности в ростовую среду вносили исследуемые соединения. Цитотоксичность соединений **IIa–e** исследовали в концентрациях от 3.115 мкмоль/л до 25 ммоль/л, соединения **I** – в диапазоне концентраций от 3.1 мкмоль/л до 200 ммоль/л. Для исследования гепатопротекторного эффекта, согласно [9], вместе с исследуемым соединением вносили токсикант – *d*-галактозамин (*d*-ГЛА) в концентрации 150 ммоль/л. Цитопротекторный эффект соединений исследован в диапазоне концентраций от 6.25 до 500 мкмоль/л. В качестве референсного контроля интактной группы использованы клетки, в ростовую среду которых при культивировании не вносили исследуемых соединений и *d*-ГЛА. В ростовую среду контрольной группы клеток (контроль *d*-ГЛА) вносили только *d*-ГЛА в концентрации 150 ммоль/л.

Для определения количества жизнеспособных клеток готовили полную ростовую среду с флуоресцентными красителями из расчета на одну лунку 198 мкл полной ростовой среды + 2 мкл DAPI (концентрация 1 мг/мл) + 0.5 мкл йодида пропидия. Далее, культуральную жидкость заменяли на приготовленную ростовую среду с красителями и инкубировали в течении 45 минут. После инкубирования проводили подсчет живых и мертвых клеток на клеточном анализаторе CyTell Cell Imaging System фирмы GE Healthcare с использованием стандартного протокола.

Исследовали влияние веществ (**IIa**), (**IIc**), (**IId**), проявивших наиболее выраженные цитопротекторные свойства и наименьшую токсичность, на клеточный цикл клеток *Chang Liver*. Для исследования клеточного цикла в ростовую среду добавляли исследуемые соединения в концентрациях 3.125–100 мкмоль/л и инкубировали 24 ч. Затем культуральную жидкость заменяли на приготовленную ростовую среду с Hoechst 33342 (концентрация 1 мг/мл) при внесении на лунку 196 мкл ростовой среды и 4 мкл Hoechst 33342 соответственно, и инкубировали в течение 45 минут. Определение клеточного цикла проводили по специальному протоколу на Cytell Cell Imaging System.

Каждый тип воздействия на клетки выполняли в трех повторах. Сравнивали полученные результаты с интактными клетками, не подвергавшимися воздействиям, и с контролем *d*-ГЛА. Рассчитывали средние значения и стандартную ошибку, сравнения между группами клеток, подвергавшимся различным воздействиям, выполняли по тесту Манн–Уитни.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН за техническую поддержку проведенных исследований.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kim M.N., Kim B.K., Han K.H.* // J. Gastroenterol. 2013. V. 48. P. 681–688. https://doi.org/10.1007/s00535-013-0770-9
2. *Измайлов С.Г., Паршиков В.В.* //Нижегородский медицинский журнал. 2002. № 3. С. 81–87.
3. *Raginov I.S., Egorov V.I., Valiullin L.R., Watanabe D., Balakin K.V., Murinov Y.I.-*// Neuroscience Letters. 2019. V. 706. P. 110–113. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.05.008
4. *Wu D., Lee S., Luo J., Xia H., Gushchina S., Richardson P.M., Yeh J., Krügel U., Franke H., Zhang Y., Bo X.* // J. Neurosci. 2018. V. 38. P. 1351–1365. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1660-17.2017
5. *Kuo W.L., Yu M.C., Lee J.F., Tsai C.N., Chen T.C., Chen M.F.* // J. Gastrointest. Surg. 2012. V. 16. P. 361–369. https://doi.org/10.1007/s11605-011-1764-7
6. *Выштакалюк А.Б., Семенов В.Э., Зобов В.В., Галяметдинова И.В., Гумарова Л.Ф., Парфенов А.А., Назаров Н.Г., Ленина О.А., Кондрашова С.А., Латыпов Ш.К., Черепнев Г.В., Шашин М.М., Резник В.С.* // Биоорган. химия. 2017. Т. 43. С. 572–580. [*Vyshtakalyuk A.B., Semenov V.E., Zobov V.V., Galyametdinova I.V., Gumarova L.F., Parfenov A.A., Nazarov N.G., Lenina O.A., Kondrashova S.A., Latypov Sh.K., Cherepnev G.V., Shashin M.S., Reznik V.S.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 604–611.] https://doi.org/10.1134/S106816201704015X
7. *Парфенов А.А., Выштакалюк А.Б., Гумарова Л.Ф., Хасаншина Л.Р., Беляев Г.П., Назаров Н.Г., Кондрашина Д.А, Галяметдинова И.В., Зобов В.В., Семенова В.Э.* // Изв. АН. Сер. хим. 2019, С. 2307–2315. [*Parfenov A.A., Vyshtakalyuk A.B., Gumarova L.F., Khasanshina L.R, Belyaev G.P., Nazarov N.G., Kondrashina D.A., Galyametdinova I.V., Zobov V.V., Semenov V.E.* // Russ. Chem. B+. 2019. Vol. 68. P. 2307–2315.] https://doi.org/10.1007/s11172-019-2704-z
8. *Выштакалюк А.Б., Семенов В.Э., Судаков И.А., Бушмелева К.Н., Гумарова Л.Ф., Парфенов А.А., Назаров Н.Г., Гиляметдинова И.В., Зобов В.*В. // Изв. АН. Сер. хим. 2018. С. 705–711. [*Vyshtakalyuk A.B., Semenov V.E., Sudakov I.A., Bushmeleva K.N., Gumarova L.F., Parfenov A.A., Nazarov N.G., Galyametdinova I.V., Zobov V.V.* // Russ. Chem. B+. 2018. V. 67. P. 705–711.] https://doi.org/10.1007/s11172-018-2126-3
9. *Миронов А.Н. и др.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. Миронова А.Н., М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
10. *Reznik V.S., Pashkurov N.G.* // Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of Chemical Science. 1965. V. 15. P. 1554–1557.

"Dual" Derivatives of Pyrimidine: Synthesis and Primary Evaluation *in vitro* of Hepatoprotective Properties

A. B. Vyshtakalyuk*, #, V. E. Semenov*, #, A. A. Parfenov*, M. S. Shashyn*, G. P. Belyaev*, I. V. Galyametdinova*, and V. V. Zobov*

#Phone: +7 (917) 229-34-85; e-mail: alex.vysh@mail.ru; +7 (905) 317-71-41; e-mail: sve@iopc.ru

**Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center of RAS, ul. Arbuzova 8, Kazan, 420088 Russia*

The synthesis of "dual" derivatives of the drug Xymedon (1,2-dihydro-4,6-dimethyl-1-N-(2-hydroxyethyl)pyrimidone-2), further pyrimidine (**I**), in which pyrimidine (**I**) molecules are joined by an alkyl (phenyl)dionate bridge was development. Primary data on the hepatoprotective activity of five "dual" pyrimidine (**I**) derivatives with different numbers of methylene groups and a meta-xylylene fragment in the ester bridge were obtained on the cell line of normal human *Chang Liver* hepatocytes. The cytotoxicity and cytoprotective properties of new compounds were determined against the background of *d*-galactosamine exposure at a concentration of 150 mmol/L and their effect on the cell cycle was studied, in comparison with the original compound **I**, the dependence of the biological properties of the studied derivatives on their structure was established.

Keywords: pyrimidines, Xymedon, hepatoprotectors, cell cycle, cytotoxicity

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 701–707

УДК 577.29

ДОСТАВКА БАРНАЗЫ К КЛЕТКАМ В СОСТАВЕ ЛИПОСОМ, ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ HER2-СПЕЦИФИЧНЫМ МОДУЛЕМ DARPin

© 2020 г. В. О. Шипунова*, Е. И. Шрамова*, А. А. Шульга*, М. В. Шилова*, С. М. Деев*, Г. М. Прошкина*, #

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

Поступила в редакцию 09.04.2020 г.
После доработки 19.04.2020 г.
Принята к публикации 21.04.2020 г.

Впервые показана возможность липосомальной формы доставки рибонуклеазы барназы к HER2-положительным раковым клеткам человека с целью их селективного уничтожения. Принцип загрузки липосом рибонуклеазой основан на электростатическом взаимодействии белка с внутренней поверхностью липосом. Специфичность липосом к поверхностному клеточному рецептору HER2 определяется наличием анти-HER2-адресного модуля DARPin на внешней мембране липосом. Показано, что специфическая в отношении HER2-положительных клеток цитотоксичность определяется именно наличием адресного HER2-специфичного модуля на поверхности липосом, а выраженность цитотоксического эффекта коррелирует с уровнем экспрессии рецептора HER2 на клеточной мембране.

Ключевые слова: адресная доставка, барназа, липосомы, DARPin

DOI: 10.31857/S0132342320060305

ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ, в структуре смертности населения планеты смерть от онкологических заболеваний занимает вторую строчку, являясь причиной каждой шестой смерти на земле. Именно поэтому, несмотря на большое количество подходов к терапии онкологических заболеваний, поиск новых форм цитотоксических агентов, обладающих минимальными побочными эффектами при максимальной цитотоксичности, равно как и поиск способов снижения вводимых доз цитотоксического агента, продолжает оставаться актуальной задачей.

В этом свете терапия, основанная на белковых препаратах (антителах, белковых токсинах, ферментах, цитокинах), приобретает ведущую роль в современных медико-биологических исследованиях [1]. Неразрывно с этим встает вопрос доставки белкового препарата к клетке-мишени, поскольку, находясь в кровотоке, препарат может проявлять низкую стабильность, подвергаться быстрому протеолизу в плазме, обладать ограниченной способностью проникать через клеточную мембрану и т.д. Благодаря бурному развитию нанотехнологических подходов, для доставки белков к мишеням организма в руках ученых появились такие наноносители, как липосомы, полимерные наногели, наночастицы различного состава [2–6]. Несомненным лидером среди наноносителей по доставке лекарств являются липосомы. Способность липосом инкапсулировать белки, их высокая биосовместимость, низкая токсичность, регулируемый размер, определяют их уникальные свойства в качестве носителя для доставки биологически активных соединений. Кроме того, ковалентное присоединение лигандов (антител, белков, углеводов) к липосомной мембране обеспечивает специфическую доставку липидных везикул к клеткам-мишеням.

В качестве адресов, специфичных к определенным поверхностным рецепторам раковых клеток, сегодня все большее внимание уделяется инновационным рецептор-спецфичным скаффолдным белкам неиммуноглобулиновой природы – аффибоди, авимеры, аднектины, антикалины, аптамеры и DARPins-белки [7]. DARPins-белки (Design Ankyrin Repeat Proteins) являются альтернативой антителам, не уступают им в аффинности, не содержат остатков цистеина в своей струк-

Автор для связи: (тел.: + 7(495) 335-37-88; эл. почта: gmb@ibch.ru).

туре, отличаются высоким уровнем экспрессии в бактериальной системе, являются мономерами в растворе, не склонны к агрегации и характеризуются высокой устойчивостью к протеазам [8].

В качестве токсического компонента в противораковой терапии одними из наиболее перспективных средств на сегодняшний день являются белки различного происхождения, нарушающие метаболические процессы непосредственно внутри клетки-мишени, такие как рибонуклеазы, рицин, лектин и т.д. [9, 10]. Так, например, на основе рибонуклеазы барназы из *Bacillus amyloliquefaciens* получено большое количество адресных иммунотоксинов, эффективных *in vitro* и *in vivo* [11, 12].

В данной работе были получены липосомы, нагруженные рибонуклеазой барназой, обладающие специфичностью по отношению к поверхностному клеточному рецептору HER2 за счет наличия анти-HER2-адресного модуля DARPin на внешней мембране липосом. На сегодняшний день это первая работа по доставке барназы к раковым клеткам в составе липосомального препарата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы разработали методику синтеза моноламилярных липосомальных HER2-специфичных препаратов диаметром 100 нм, нагруженных цитотоксическим компонентом – фрагментом А псевдомонадного экзотоксина [3]. Данная методика позволяет включать в липосому большое количество молекул белка (порядка 2000) за счет электростатического взаимодействия между белком и внутренней поверхностью липосомы, а функционализация внешней поверхности липосомы HER2-специфичным модулем DARPin обеспечивает избирательную цитотоксичность препарата.

Поверхностный клеточный рецептор HER2 сверхэкспрессируется в 20–30% опухолей молочной железы и яичников [13–15]. Как правило, сверхэкспрессия этого рецептора коррелирует с агрессивным фенотипом опухоли и активным метастазированием [16, 17].

Сверхэкспрессия HER2 при злокачественной трансформации клетки делает его привлекательной мишенью для адресной терапии рака [18], поскольку в норме HER2 экспрессируется на поверхности эпителиальных клеток в небольших количествах.

В данной работе было показано, что принцип загрузки липосом белком, основанный на электростатическом взаимодействии, эффективен, в частности, для рибонуклеазы барназы.

Гены белков DARPin и барназы экспрессировали в штамме *E. coli* BL21(DE3) по методу автоиндукции. Автоиндукционная среда, благодаря наличию эквимолярных концентраций гидрофосфата натрия и дигидрофосфата калия, препятствует закислению культуральной среды в результате метаболизма бактерий и обеспечивает поддержание нейтрального pH даже при достижении культурой высоких плотностей (OD_{600} ~ 10). Сбалансированные концентрации глюкозы, лактозы и глицерина, а также высокая интенсивность перемешивания культуры (~250 об./мин) позволяют индуцировать экспрессию гена целевого белка автоматически (при истощении в среде глюкозы), не прибегая к контролю плотности культуры.

Белки очищали с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии, как описано в "Экспериментальной части". Электрофоретический анализ очищенных белков показал, что их молекулярная масса соответствует расчетной (18 кДа для DARPin и 12 кДа барназы), а чистота белка удовлетворяет требованиям работы с культурами клеток эукариот (рис. 1*а*).

Поскольку методика очистки барназы включает этап денатурации и рефолдинга (для разрушения комплекса барназа-барстар), о сохранении функциональной активности барназы судили по ее способности гидролизовать РНК. РНКазную активность барназы определяли методом кислотонерастворимого осадка РНК [19]. Согласно [19], 1 единица рибонуклеазной активности в исследуемой пробе вызывает приращение OD_{260} на 1 единицу. Таким образом, энзиматическая активность очищенного препарата барназы, определенная данным методом, составляет 93.5×10^6 ед. акт./М.

Как отмечалось выше, принцип загрузки липосом белками основан на электростатическом взаимодействии положительно заряженного белка (для барназы pI 9.4, рабочий буфер для загрузки – pH 7.5) с отрицательно заряженной поверхностью мембраны липосомы. Метод инкапсуляции белка в липосому включал: электростатическое связывание белка с фосфолипидами, процедуру 5-кратного замораживания-оттаивания, экструзию суспензии через 100-нм поликарбонатный фильтр, хроматографическую очистку протеолипосом от невключенного белка при умеренно щелочном pH и высокой ионной силе (pH 7.5, 200 мМ NaCl). В этих условиях молекулы белка диссоциируют от внешней поверхности липосом.

Функционализацию протеолипосом адресным модулем DARPin осуществляли в три стадии как описано в "Экспериментальной части": 1. Введение с помощью реагента Траута (2-иминотиолан) SH-групп в липиды, содержащие первичные амины (фосфатидиламин); 2. Модификация аминогрупп DARPin кросс-сшивающим реагентом сульфо-EMCS (N-ε-малеимидокапроил-оксисульфосукцинимидный эфир); 3. Ковалентное присоедине-

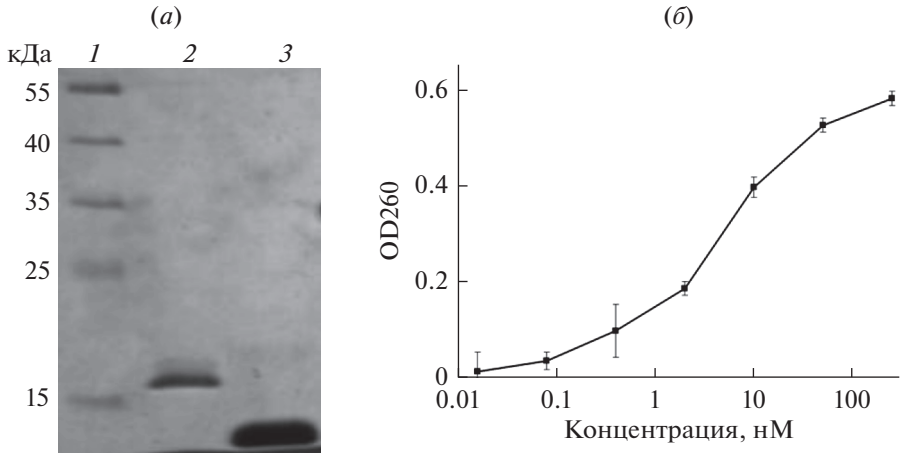


Рис. 1. Характеристика белков DARPin и барназы. (*а*) результат электрофоретического разделения белков в 13.5% ПААГ после металл-хелатной аффинной хроматографии. Дорожки: *1* – маркер молекулярных масс Page Ruler Prestained Protein ("Thermo Fisher", США), *2* – DARPin, *3* – барназа. (*б*) РНКазная активность барназы, определенная методом кислотно-нерастворимого осадка. Большим значениям оптической плотности (OD_{260}) соответствует большая ферментативная активность белка.

ние Траут-модифицированных липосом к сульфо-EMCS-модифицированному белку.

Размер и поверхностный заряд адресных (DARPin-Lip-Bn) и безадресных (Lip-Bn) липосом, нагруженных барназой, определяли методом динамического и электрофоретического светорассеяния (рис. 2*а*–2*в*). Гидродинамический размер составил 108 ± 36 нм для Lip-Bn и 117 ± 41 нм для DARPin-Lip-Bn (рис. 2*а*, 2*б*), ζ-потенциал: –35.9 ± 0.3 мВ для Lip-Bn и –49.5 ± 2 мВ для DARPin-Lip-Bn (рис. 2*в*). Эти данные однозначно доказывают высокую эффективность химической конъюгации адресного модуля DARPin с поверхностью липосом (незначительное увеличение размера и уменьшение ζ-потенциала), а также свидетельствуют о сохранении коллоидной стабильности полученных конъюгатов в солевых растворах.

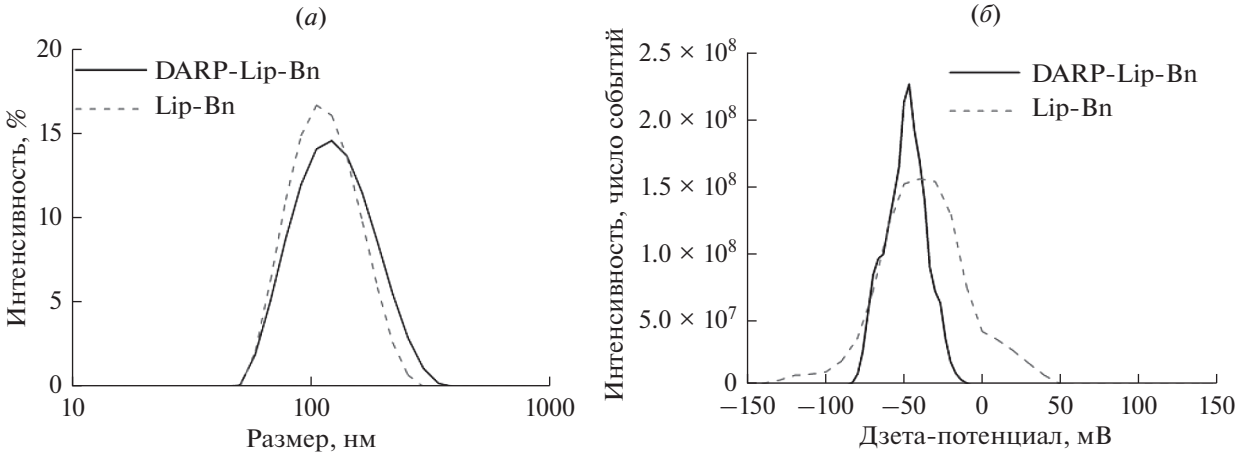
Способность моноламилярных липосом, загруженных барназой и функционализированных адресным модулем DARPin, селективно взаимодействовать с рецептором HER2 на поверхности HER2-положительных клеток и вызывать их гибель была изучена стандартным методом MTT *in vitro* на двух клеточных линиях аденокарциномы молочной железы человека, характеризующихся различным уровнем экспрессии рецептора HER2: SK-BR-3 – высокий уровень экспрессии, MDA-MB-231 – низкий уровень экспрессии.

Показано, что адресные липосомы, нагруженные барназой, эффективно подавляют жизнеспособность HER2-положительных клеток SK-BR-3 (IC_{50} = 47.5 нМ) (рис. 2*г*). Жизнеспособность клеток MDA-MB-231, характеризующихся нормальным уровнем экспрессии рецептора HER2, в проанализированном диапазоне концентраций отличается слабой чувствительностью к препарату (14.5% смертности при максимально использованной концентрации адресных липосом, нагруженных барназой). Отметим, что безадресные липосомы, нагруженные барназой, цитотоксичностью не обладают (рис. 2*д*). Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что специфическая в отношении HER2-положительных клеток цитотоксичность определяется именно наличием адресного HER2-специфичного модуля на поверхности липосом, а выраженность цитотоксического эффекта коррелирует с уровнем экспрессии рецептора HER2 на клеточной мембране.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспрессия, выделение и очистка белков. Экспрессию целевых белков DARPin и барназы проводили в штамме BL21(DE3) *E. coli* по методу автоиндукции [20]. Свежие трансформанты (из расчета одна колония на 1 мл среды) инокулировали в 50 мл среды, содержащей 1% дрожжевого экстракта, 1% триптона, 25 мМ Na_2HPO_4, 25 мМ KH_2PO_4, 100 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$ и 0.1 г/л ампициллина. Растили 24 ч при 25°C в условиях интенсивной аэрации. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 6000 *g* и 4°C. Для того, чтобы иметь возможность очистить белки с помощью металл-аффинной хелатной хроматографии, в последовательностях белков была предусмотрена гексагистидиновая метка.

Выделение барназы проводили следующим образом. Осадок клеток ресуспендировали в буфере T2 (200 мМ NaCl, 30 мМ NaH_2PO_4, 2 мМ Tris-HCl, pH 8.3), клетки разрушали на ледяной бане с помо-



(в)

Липосомы	Гидродинамический размер, нм	Дзета-потенциал, мВ
Lip-Bn	108 ± 36	−35.9 ± 0.3
DARP-Lip-Bn	117 ± 41	−49.5 ± 2

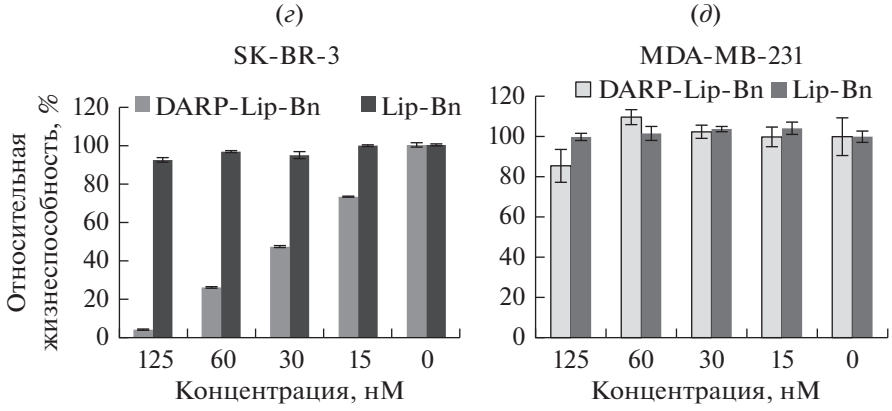


Рис. 2. Функциональная характеристика липосомных комплексов. (*а*) распределение по размерам адресных и безадресных липосом, нагруженных барназой, полученное методом динамического светорассеяния. (*б*) распределение по ζ-потенциалам адресных и безадресных липосом, нагруженных барназой, полученное методом электрофоретического светорассеяния. (*в*) гидродинамический размер и ζ-потенциал адресных и безадресных липосом, нагруженных барназой. (*г*, *д*) относительная жизнеспособность клеток с различным уровнем экспрессии рецептора HER2 после их обработки липосомальными препаратами в течение 72 ч.

щью ультразвукового дезинтегратора. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 15000 *g* в течение 30 мин. Супернатант пропускали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм и наносили на колонку Ni^{2+}-NTA Sepharose (GE Healthcare Life Sciences) согласно протоколу производителя. Белки, не связавшиеся с сорбентом, удаляли при промывании колонки буфером Т2. Ингибитор барназы барстар, сопутствующий всем рекомбинантным белкам, содержащим барназный модуль, удаляли раствором 6 М гуанидинхлорида в буфере Т2. Ренатурацию проводили в нисходящем градиенте гуанидинхлорида. После полного замещения буфера с гуанидинхлорида на буфер Т2, белки элюировали буфером Т2 с 150 мМ имидазолом.

Для выделения DARPin клеточный осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 0.3 М NaCl, 20 мМ Na-фосфат, 30 мМ имидазол, 0.5 мг/мл лизоцим (pH 8.0). Клетки разрушали ультразвуком на ледяной бане. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 15000 *g*, 25 мин, 4°C. Супернатант пропускали через 0.22-мкм фильтр и наносили на колонку Ni^{2+}-NTA HisTrap column (GE Healthcare, USA), уравновешенную связы-

вающим буфером (0.3 M NaCl, 30 мМ имидазол, 20 мМ Na-фосфат, pH 8.0). Колонку промывали 20 объемами связывающего буфера, после чего проводили элюцию целевого белка градиентом имидазола от 0.1 до 0.5 М.

Аутентичность полученных белков доказывали с помощью электрофореза в ПААГ.

Характеристика РНКазной активности баранзы. Энзиматическую активность барназы определяли методом кислотно-нерастворимого осадка РНК [19]. Исследуемую пробу белка растворяли в концентрации 1.25 мкМ в 0.125 М Tris-HCl, pH 8.5 и затем получали серию последовательных 5-кратных разведений образца в том же буфере. В качестве контрольного образца использовали раствор 0.125 М Tris-HCl, pH 8.5. К 40 мкл каждого образца добавляли 160 мкл раствора дрожжевой РНК (в концентрации 2 г/л) в 0.125 М Tris-HCl, pH 8.5 на льду. Реакционную смесь инкубировали 15 мин при 37°C. Если исследуемая проба обладала рибонуклеазной активностью, то в реакционной смеси образовывалась смесь фрагментов РНК различной длины: в образцах с высокой концентрацией РНКазы преобладали мононуклеотиды, в образцах с низкой концентрацией РНКазы – нерасщепленные полинуклеотиды. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл холодной 6% хлорной кислоты и инкубировали смесь 15 мин при 0°C. При инкубации с хлорной кислотой большие фрагменты РНК образуют осадок, который осаждали центрифугированием при 16000 *g* в течение 10 мин при 0°C. Супернатанты разбавляли в 10 раз и измеряли оптическую плотность при 260 нм (OD_{260}) относительно контрольного образца. Большим значениям оптической плотности соответствовала большая рибонуклеазная активность.

Получение липосом, нагруженных барназой и модифицированных адресным модулем DARPin по внешней поверхности липидной мембраны. Для приготовления суспензии липидов 0.2 г L-α-фосфатидилхолина (Avanti Polar Lipids, Soy 40%), содержащего 16% фосфатидилэтаноламина, растворяли в 10 мл воды и выдерживали 16–20 ч при комнатной температуре. Затем суспензию пропускали через 0.8 мкм фильтр и хранили при 4°C.

0.5 мл суспензии фосфолипидов смешивали с 0.5 мл барназы (40 мг/мл) в буфере 20 мМ Na-фосфат (pH 7.5). Белково-липидную суспензию подвергали пятикратной процедуре замораживания-оттаивания, после чего, используя экструдер Avanti Mini Extruder, 19 раз пропускали через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 100 нм. Липосомы отделяли от избытка барназы на колонке Sepharose CL-2B (10 × 35 мм), уравновешенной 10 мМ Na-фосфатным буфером (pH 7.5), содержащим 0.2 М NaCl.

Ковалентное присоединение DARPin к внешней поверхности липосом. Ковалентное присоединение DARPin к внешней поверхности мембраны липосом включало присоединение SH-групп к первичным аминам фосфатидилэтаноламина с использованием реагента Траута (2-иминотиолан) и последующую кросс-сшивку с адресным модулем DARPin, модифицированного по аминогруппам билинкером сульфо-EMCS (N-ε-малеимидокапроил-оксисульфосукцинимидный эфир). Липосомы, нагруженные барназой, инкубировали с 6 М реагентом Траута в 100 мМ Na-фосфатном буфере (pH 8.0) в течение часа при комнатной температуре. Инкубационную смесь очищали от избытка реагента на колонке NAP-5 (GE Healthcare, USA), уравновешенной 100 мМ Na-фосфатным буфером (pH 7.5).

DARPin (5 мг/мл) инкубировали с 3-кратным избытком сульфо-EMCS в течение 45 мин при комнатной температуре. От избытка сульфо-EMCS избавлялись, пропуская смесь через колонку NAP-5 (GE Healthcare, USA), уравновешенную 100 мМ Na-фосфатным буфером (pH 7.5). DARPin, конъюгированный с сульфо-EMCS, смешивали с липосомами, модифицированными реагентом Траута, и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. От не связавшегося с поверхностью липосом DARPin, смесь очищали с использованием колонки Sepharose CL-2B (10 × 35 мм), уравновешенной 20 мМ Na-фосфатным буфером (pH 7.5).

Измерение размера и ζ-потенциала липосом. Гидродинамический размер и ζ-потенциал адресных и безадресных липосом, нагруженных барназой, определяли с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) в 10 мМ KNO_3 при температуре 25°C. Измерения проводили в триплетах.

Культивирование эукариотических линий. В работе использовали следующие клеточные линии: SK-BR-3 (аденокарцинома молочной железы человека, номер по каталогу ATCC – HTB-30), MDA-MB-231 (карцинома молочной железы человека, номер по каталогу ATCC – HTB-26).

Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США) и 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия), при 37°C в атмосфере 5% CO_2.

Изучение цитотоксичности HER2-специфичного токсина *in vitro*. Для изучения цитотоксичности адресных и безадресных липосом, нагруженных барназой, клетки высевали по 100 мкл на лунку в 96-луночные планшеты (Eppendorf) из стока 3.5×10^4 (SK-BR-3) или 2×10^4 (MDA-MB-231) клеток/мл и культивировали в течение ночи. После этого ростовую среду в лунках заменяли на

свежую, содержащую различные концентрации липосомальных препаратов, клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 72 ч.

Жизнеспособность клеток оценивали методом MTT [21]. Относительную жизнеспособность клеток рассчитывали как отношение усредненной оптической плотности в лунках с обработанными клетками к усредненной оптической плотности в лунках с необработанными клетками (контроль), выраженное в процентах. Расчет IC_{50} (концентрация препарата, снижающая жизнеспособность клеток в 2 раза относительно контроля) определяли методом нелинейной регрессии с использованием программы Excel.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00112).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Leader B., Baca Q.J., Golan D.E.* // Nat. Rev. Drug Discov. 2008. V. 7. P. 21–39. https://doi.org/10.1038/nrd2399
2. *Gu Z., Biswas A., Zhao M., Tang Y.* // Chem. Soc. Rev. 2011. V. 40. P. 3638–3655. https://doi.org/10.1039/c0cs00227e
3. *Deyev S., Proshkina G., Baryshnikova O., Ryabova A., Avishai G., Katrivas L., Giannini C., Levi-Kalisman Y., Kotlyar A.* // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2018. V. 130. P. 296–305. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.06.026
4. *Zelepukin I.V., Yaremenko A.V., Shipunova V.O., Babenyshev A.V., Balalaeva I.V., Nikitin P.I., Deyev S.M., Nikitin M.P.* // Nanoscale. 2019. V. 11. P. 1636–1646. https://doi.org/10.1039/c8nr07730d
5. *Belogurov A.A., Jr., Stepanov A.V., Smirnov I.V., Melamed D., Bacon A., Mamedov A.E., Boitsov V.M., Sashchenko L.P., Ponomarenko N.A., Sharanova S.N., Boyko A.N., Dubina M.V., Friboulet A., Genkin D.D., Gabibov A.G.* // FASEB J. 2013. V. 27. P. 222–231. https://doi.org/10.1096/fj.12-213975
6. *Durova O.M., Vorobiev I.I., Smirnov I.V., Reshetnyak A.V., Telegin G.B., Shamborant O.G., Orlova N.A., Genkin D.D., Bacon A., Ponomarenko N.A., Friboulet A., Gabibov A.G.* // Mol. Immunol. 2009 V. 47. P. 87–95. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.12.020
7. *Vazquez-Lombardi R., Phan T.G., Zimmermann C., Lowe D., Jermutus L., Christ D.* // Drug Discov. Today. 2015. V. 20. P. 1271–1283. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.09.004
8. *Shilova O.N., Deyev S.M.* // Acta Naturae. 2019. V. 11. P. 42–53. https://doi.org/10.32607/20758251-2019-11-4-42-53
9. *Frankel A.E., Woo J.-H., Neville D.M.* // Principles of Cancer Biotherapy. 2009. P. 407–449. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2289-9_11
10. *Шрамова Е.И., Деев С.М., Прошкина Г.М.* // Биоорган. химия. 2018. Т. 44. С. 664–668. [*Shramova E.I., Deyev S.M., Proshkina G.M.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 755–758.] https://doi.org/10.1134/S0132342318060106
11. *Edelweiss E., Balandin T.G., Ivanova J.L., Lutsenko G.V., Leonova O.G., Popenko V.I., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M.* // PLoS One. 2008. V. 3. P. e2434. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002434
12. *Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N.V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M.* // Invest New Drugs. 2011. V. 29. P. 22–32. https://doi.org/10.1007/s10637-009-9329-2
13. *Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L.* // Science. 1987. V. 235. P. 177–182. https://doi.org/10.1126/science.3798106
14. *Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J., Stuart S.G., Udove J., Ullrich A., et al.* // Science. 1989. V. 244. P. 707–712. https://doi.org/10.1126/science.2470152
15. *Шрамова Е.И., Прошкина Г.М., Деев С.М.* // Биоорган. химия. 2018. Т. 44. С. 267–277. [*Shramova E.I., Proshkina G.M., Deyev S.M.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 279–288.] https://doi.org/10.7868/S0132342318030028
16. *Holbro T., Hynes N.E.* // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2004. V. 44. P. 195–217. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121440
17. *Yan M., Schwaederle M., Arguello D., Millis S.Z., Gatalica Z., Kurzrock R.* // Cancer Metastasis Rev. 2015. V. 34. P. 157–164. https://doi.org/10.1007/s10555-015-9552-6
18. *Kuzichkina E.O., Shilova O.N., Deyev S.M.* // Acta Naturae. 2018. V. 10. P. 87–94. https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-4-87-94
19. *Rushizky G.W., Greco A.E., Hartley R.W., Sober H.A.* // Biochemistry. 1963. V. 2. P. 787–793. https://doi.org/10.1021/bi00904a028
20. *Studier F.W.* // Protein Expr. Purif. 2005. V. 41. P. 207–234. https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016
21. *Mosmann T.* // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. P. 55–63. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4

Delivery of Barnase to Cells in Liposomes Functionalized by HER2-Specific DARPin Module

V. O. Shipunova*, E. I. Shramova*, A. A. Schulga*, M. V. Shilova*, S. M. Deyev*, and G. M. Proshkina*,#

#Phone: + 7(495) 335-37-88; e-mail: gmb@ibch.ru

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

In this work for the first time we demonstrate the possibility of ribonuclease barnase delivery to HER2-positive human cancer cells in a liposomal form. The principle of loading liposomes with ribonuclease is based on the electrostatic interaction of the protein with the inner surface of the liposomes. The specificity of liposomes to the HER2-receptor is determined by the presence of the anti-HER2-address module DARPin on the outer membrane of the liposome. It was shown that cytotoxicity specific for HER2-positive cells is determined precisely by the presence of an address HER2-specific module on the surface of liposomes, and the severity of the cytotoxic effect correlates with the level of expression of the HER2 receptor on the cell membrane.

Keywords: targeted delivery, *barnase*, *liposomes*, *DARPin*

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 708–718

УДК 577.322

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНОГО ЦИТОХРОМА *c* С ЛИПОСОМАМИ, МИТОХОНДРИЯМИ И МИТОПЛАСТАМИ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

© 2020 г. И. Д. Гусев*, А. М. Фирсов, Р. В. Черткова*, ***, #, Е. А. Котова**, Д. А. Долгих*, ****, М. П. Кирпичников*, ****, Ю. Н. Антоненко**, #**

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

***НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/40*

****НИУ Высшая школа экономики, факультет биологии и биотехнологии, Россия, 117312 Москва, ул. Вавилова, 7*

*****МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/12*

Поступила в редакцию 30.04.2020 г.
После доработки 10.05.2020 г.
Принята к публикации 12.05.2020 г.

Исследовано взаимодействие меченного флуоресцентным красителем сульфоцианином-3 Cys-замещенного (G56C) цитохрома *c* (фЦит) с искусственными и природными липидными мембранами методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии. Показано, что по сравнению с митохондриями митопласты характеризуются большим количеством сайтов связывания фЦит, при этом обладающих меньшим сродством к этому белку. Показано также, что сродство фЦит к кардиолипин-содержащим липосомам зависит от содержания кардиолипина в липосомах и снижается при повышении ионной силы раствора. Высокая константа связывания фЦит с митохондриями может объясняться наличием на поверхности внешней мембраны специфических сайтов связывания этого белка, отличных от сайтов, характерных для митопластов и липосом. Этот вывод подтверждается тем наблюдением, что фЦит вытесняется с поверхности митохондрий немеченым мутантным вариантом K8T эффективнее, чем цитохромом *c* дикого типа, тогда как в случае митопластов и липосом цитохром *c* вытесняет фЦит эффективнее, чем вариант K8T.

Ключевые слова: цитохром c, кардиолипин, митохондрии, митопласты, флуоресцентная корреляционная спектроскопия

DOI: 10.31857/S0132342320060081

ВВЕДЕНИЕ

Гемсодержащий белок цитохром *c*, один из важнейших компонентов электрон-транспортной или дыхательной цепи (ЭТЦ) митохондрий, переносит электроны от убихинол-цитохром *c*-оксидоредуктазы (комплекс III) к цитохром *c*-оксидазе (комплекс IV). Наряду с участием в электронном транспорте, другой его важнейшей функцией является инициация клеточного апоптоза путем участия в формировании апоптосомы [1]. В настоящий момент значительные усилия направлены на исследование цитохрома *c* в качестве триггера и посредника апоптотических событий.

Программируемая клеточная гибель, или апоптоз, имеет исключительную важность для нормальной жизнедеятельности организма в целом. Во время активации каскада событий, приводящих к апоптозу клетки, цитохром *c* транслоцируется через внешнюю мембрану митохондрии в цитозоль, где он либо усиливает внешний апоптотический сигнал, либо инициирует активацию каспазного каскада по собственному (цитохром *c*-зависимому) апоптотическому пути. Ключевым событием в цитохром *c*-зависимом апоптотическом пути является пермеабилизация внешней митохондриальной мембраны, в результате чего в

Сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин; ДМСО – диметилсульфоксид; КЛ – кардиолипин; ФКС – флуоресцентная корреляционная спектроскопия; ФХ – яичный фосфатидилхолин; фЦит – флуоресцентно-меченый цитохром *c*; ЭГТА – этиленгликольтетрауксусная кислота; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; WT – wild type, дикий тип цитохрома *c*; 4Mut – мутантный вариант цитохрома *c* с заменами K72E/E69K/K86E/K87E.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 335-28-88; эл. почта: cherita@inbox.ru; antonen@belozersky.msu.ru).

цитозоль выходят различные апоптогенные факторы, в том числе и цитохром *c*. В связи с этим большой интерес вызывает изучение механизмов взаимодействия цитохрома *c* с липидными мембранами. Взаимодействие цитохрома *c* с кардиолипином – липидом, входящим в состав внутренней мемебраны митохондрии, – значительно усиливает его пероксидазную активность [2, 3]. Предполагается, что посредством запуска перекисного окисления мембранных липидов именно пероксидазная активность способствует транслокации цитохрома *c* через внешнюю мембрану митохондрий [4]. Следует отметить также, что кардиолипин, сам по себе [5] или в комплексе с цитохром *c*-оксидазой [6], формирует мембранный сайт связывания цитохрома *c* на внешней поверхности внутренней мембраны митохондрий и в условиях гомеостаза.

Известно, что связывание цитохрома *c* с кардиолипином на первых стадиях обратимо, зависит от pH [5] и приводит к изменению третичной и вторичной структуры молекулы цитохрома *c* [7]. Фактором, влияющим на стабильность комплекса цитохром *c*/кардиолипин, является окисление кардиолипина, так как цитохром *c* имеет пониженное сродство к окисленному липиду [8]. Вместе с тем, механизмы взаимодействия цитохрома *c* с кардиолипином в митохондриальной мембране остаются не до конца изученными и привлекают пристальное внимание исследователей [9–14].

При помощи флуоресцентно-меченого варианта лошадиного цитохрома *c* методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС) исследовано взаимодействие экзогенного цитохрома *c* с природными (митохондрии и митопласты) и искусственными (кардиолипин-содержащими липосомами) липидными мембранами, а также влияние на этот процесс ионной силы и содержания кардиолипина в липидной мембране.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение флуоресцентно-меченого цитохрома *c*. В качестве стратегии мечения цитохрома *c* нами была выбрана конъюгация молекул белка и малеимидного производного сульфоцианина 3 через остаток Cys, введенный в цитохром *c* с помощью сайт-направленного мутагенеза. Реакция тиолов с малеимидами широко используется для биоконъюгации и мечения биомолекул, в том числе белков и пептидов [15]; данную реакцию можно проводить в водной среде, что существенно облегчает процедуру.

Введение в молекулу цитохрома *c* тиоловой группы может быть осуществлено путем единичной замены в ходе мутагенеза поверхностного или концевого аминокислотного остатка на остаток Cys. Очевидно, что остаток, заменяемый на остаток Cys, не должен быть вовлечен во взаимодействия с кардиолипином и белками-партнерами цитохрома *c*, а также быть значимым для структурно-функциональной целостности белка.

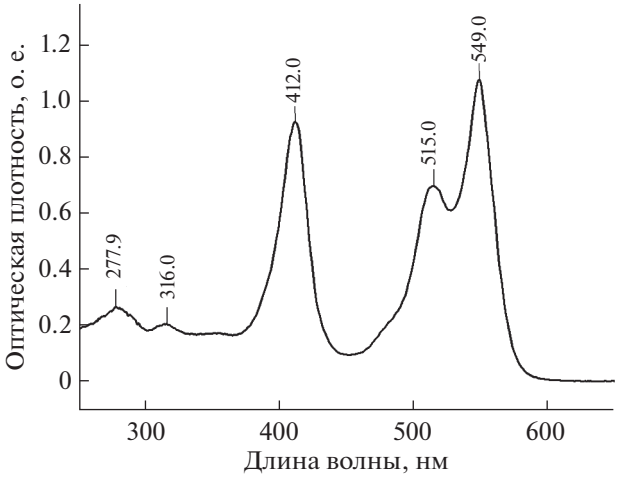


Рис. 1. Спектр флуоресцентно-меченого цитохрома *c* с заменой G56C. Поглощение при 412 нм соответствует максимуму поглощения цитохрома *c*, при 549 нм – максимуму поглощения сульфоцианина.

Известно, что на поверхности цитохрома *c* имеется три участка связывания с кардиолипином: сайт связывания A, состоящий из остатков K72, K73, K86, K87 и R91 [16]; сайт связывания L, состоящий из остатков K22, K25, K27, а также H33, который принимает участие в связывании цитохрома *c* с кардиолипином при pH < 7.0; сайт связывания C, содержащий остатки N52, H26 и P44 [17]. Кроме того, известны участки связывания цитохрома *c* с цитохром *c*-оксидазой (а.к.о. K8, K13, K72, K86, и K87) [18], с убихинол-цитохром *c*-оксидоредуктазой (а.к.о. K7, K8, K13, K39, K72, K79, K86, K87) [19] и цитохром *c*-пероксидазой (а.к.о. K13, K27, K72, K86, K87, Q12 и Q16) [20, 21].

Для введения флуоресцентной метки в молекулу цитохрома *c* нами был сконструирован и получен мутантный вариант цитохрома *c* с заменой остатка G56 на остаток Cys, так как функциональная группа остатка G56 расположена на поверхности белковой глобулы и не входит ни в один из известных сайтов связывания белка.

Реакцию мечения, а также очистку и анализ продуктов реакции проводили согласно методике, описанной в экспериментальной части. Фракции, в которых соотношение пиков цитохрома *c* и сульфоцианина было сопоставимым (рис. 1), объединяли и обессоливали на этой же колонке, уравновешенной бессолевым буфером, после чего анализировали спектрофотометрически.

Исследование взаимодействия флуоресцентно-меченого цитохрома *c* с липидными мембранами осуществляли при помощи ФКС. Этот метод осно-

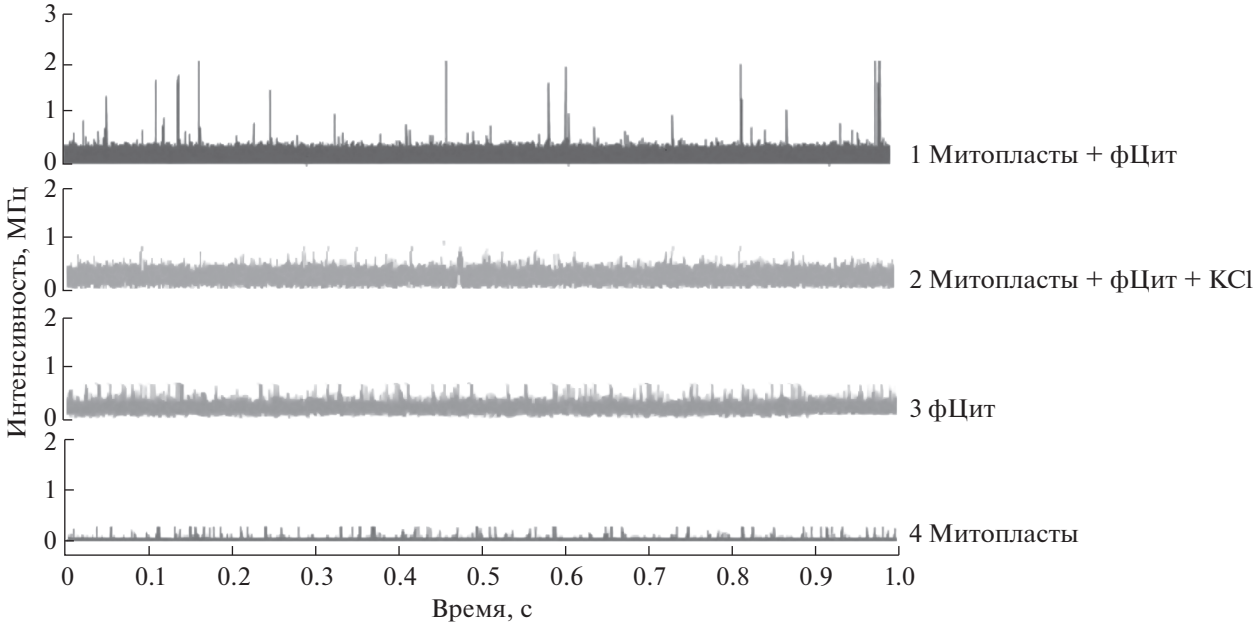


Рис. 2. Временные зависимости интенсивности пиков флуоресценции суспензии митопластов (4), раствора меченого цитохрома *c* (3), суспензии митопластов в присутствии меченого цитохрома *c* (1), суспензии митопластов в присутствии меченого цитохрома *c* и 50 мМ KCl (2). Измерения проводили в сахарозном буфере (180 мМ сахарозы, 10 мМ KCl, 10 мМ Tris, 10 мМ MES, pH 7.4). Конечная концентрация митопластов составила 0.1 мг/мл, концентрация меченого цитохрома *c* 0.26 мкМ, время сбора данных составляло 30 с.

ван на регистрации флуктуаций флуоресценции отдельных частиц, возникающих в результате броуновского движения через освещенный лазером малый объем пространства (конфокальный объем). Традиционно ФКС используется для исследования процессов, связанных с изменением подвижности молекул и комплексов: агрегации частиц, взаимодействия флуоресцирующих молекул с надмолекулярными комплексами, липидными везикулами, при этом диапазон размеров изучаемых объектов очень широк – от молекул красителей до частиц с размерами, составляющими сотни нанометров [22].

В ходе работы аналитическим сигналом для идентификации связывания являлось изменение количества пиков, регистрируемых в конфокальном объеме. Пики сигнала флуоресценции связаны с перемещением флуоресцирующих частиц через измеряемый объем при перемешивании суспензии частиц. Это могут быть как свободные молекулы меченого белка, так и намного ярче светящиеся частицы мембран со связавшимися с ними несколькими молекулами белка. На рис. 2 представлены типичные записи сигнала для суспензии митопластов и раствора меченого цитохрома *c* (фЦит). Связывание фЦит с митопластами характеризовалось большим количеством пиков с высокой интенсивностью флуоресценции (1), тогда как в растворе несвязанного флуоресцентномеченого цитохрома *c* (3) регистрировались фоновые пики небольшой интенсивности. В суспензии митопластов в отсутствие меченого белка практически отсутствовали характерные для комплексов пики (4), так же, как и в случае дестабилизированного повышением ионной силы комплекса фЦит/митопласты (2).

На рис. 3 представлено типичное распределение пиков флуоресценциии по их интенсивности после обработки экспериментальных данных в программе Saligat. Для идентификации связывания нами был выбран феноменологический порог интенсивности в 1.4 МГц. Использование большей величины порога слишком сильно обедняло статистику по пикам, в то время как меньшая величина порога была слишком близка к шуму усилителя, что вносило искажения в регистрируемую статистику.

Роль кардиолипина в связывании цитохрома *c* с липосомами. На рис. 4 представлена зависимость эффективности связывания меченого цитохрома *c* с липосомами, содержащими различное количество кардиолипина (от 0 до 100%). Анализируя полученные результаты, можно сделать заключение, что эффективность связывания фЦит с липидной мембраной возрастает при увеличении содержания в ней кардиолипина и это, по-видимому, связано с тем, что количество сайтов связывания цитохрома *c* на поверхности липосом напрямую зависит от процентного содержания в них кардиолипина и достигает максимального зна-

чения при взаимодействии с липосомами, состоящими на 100% из кардиолипина.

Определение кажущихся констант вытеснения цитохрома *c* с различными мембранами. Для определения кажущихся констант вытеснения цитохрома *c* из комплекса с липидными мембранами был использован метод вытеснения фЦит из комплекса с мембранами при помощи немеченого цитохрома *c* с подсчетом количества пиков флуоресценции с интенсивностью 1.4 МГц (рис. 5). Метод вытеснения основывается на понижении концентрации флуоресцентно-меченого компонента комплекса путем замещения немеченым белком при повышении концентрации последнего в растворе. При этом наблюдаемое уменьшение количества пиков было вызвано вытеснением флуоресцентно-меченого цитохрома *c* из комплекса с исследуемой липидной мембраной по мере увеличения в среде концентрации немеченого цитохрома *c* от 10 нМ до 100 мкМ. Количество пиков подсчитывали при помощи программы Saligat, кривые вытеснения анализировали при помощи программы GraphPrism 8 на основании уравнения $y = (B_{max}X^H)/(K_b^H + X^H)$, и определяли основные характеристики связывания (см. Экспериментальную часть): максимальное количество пиков флуоресценции (B_{max}), константу вытеснения (K_b) и коэффициент кооперативности связывания (коэффициент Хилла, H). Максимальное количество пиков флуоресценции B_{max} отражает концентрацию флуоресцирующих частиц в системе, а также зависит от количества сайтов связывания фЦит на одной частице. В этом уравнении X обозначает концентрацию цитохрома *c*. Константа вытеснения отражает усредненное значение константы диссоциации всех сайтов связывания, с которыми мог связаться меченый цитохром *c*. Таким образом, различия констант вытеснения обусловлены различием сродства липидных мембран к цитохрому *c*. Коэффициент Хилла отражает влияние повышения (положительная кооперативность) или понижения (отрицательная кооперативность) сродства сайтов связывания на липидных мембранах при протекании процесса связывания с ними белка. Следует сказать, что данное уравнение применимо для анализа при выполнении двух условий: (1) концентрация фЦит должна быть много больше, чем концентрация центров связывания; (2) при выбранных концентрациях фЦит и мембран должно быть обеспечено насыщение связывания. При проведении наших опытов данные условия соблюдались лишь частично, поэтому вместо истинных констант связывания в опытах оценивались кажущиеся константы связывания. Кажущаяся константа вытеснения в случае комплекса фЦит с митопластами существенно превышает таковые для комплексов с митохондриями и составляет 25 мкМ (табл. 1). При этом максимальное количество регистрируемых пиков флуоресценции в случае комплекса с митопластами больше, чем для комплексов с митохондриями. Поскольку концентрация частиц митохондрий и митопластов в наших опытах была одинакова, то эти данные свидетельствуют о том, что на мембранах митопластов имеется существенно большее количество сайтов связывания фЦит. Однако различия в величинах K_b говорит о том, что сродство к белку

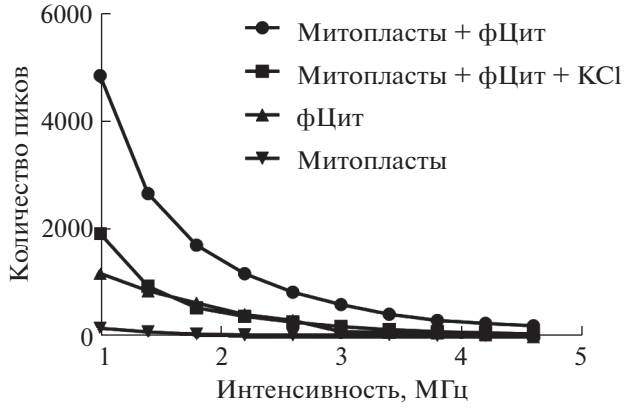


Рис. 3. Распределение регистрируемых пиков флуоресценции по интенсивности в суспензии митопластов и растворе меченого цитохрома *c*, а также при взаимодействии меченого цитохрома *c* с митопластами, в том числе в условиях повышенной ионной силы 50 мМ KCl. Условия измерений даны в подписи к рис. 2.

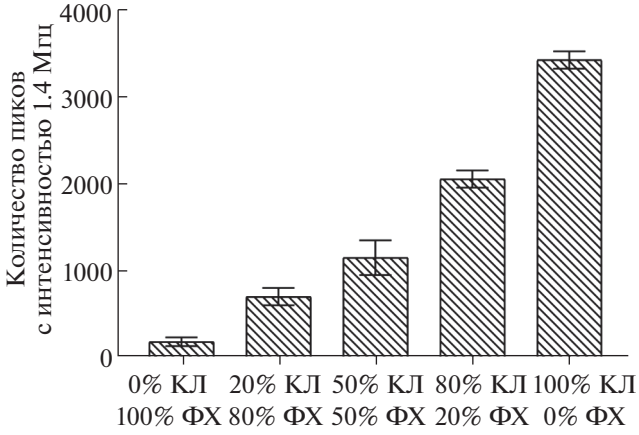


Рис. 4. Влияние содержания (%) кардиолипина в составе липосом на сродство цитохрома *c* к липосомам, выраженное в количестве пиков с интенсивностью 1.4 МГц. Данные приведены для липосом состава "яичный фосфатидилхолин–кардиолипин" в различных соотношениях. Измерения проводили в сахарозном буфере (180 мМ сахарозы, 10 мМ KCl, 10 мМ Tris, 10 мМ MES, pH 7.4). Конечная концентрация липосом различного состава – 0.5 мг/мл, концентрация меченого цитохрома *c* – 0.26 мкМ.

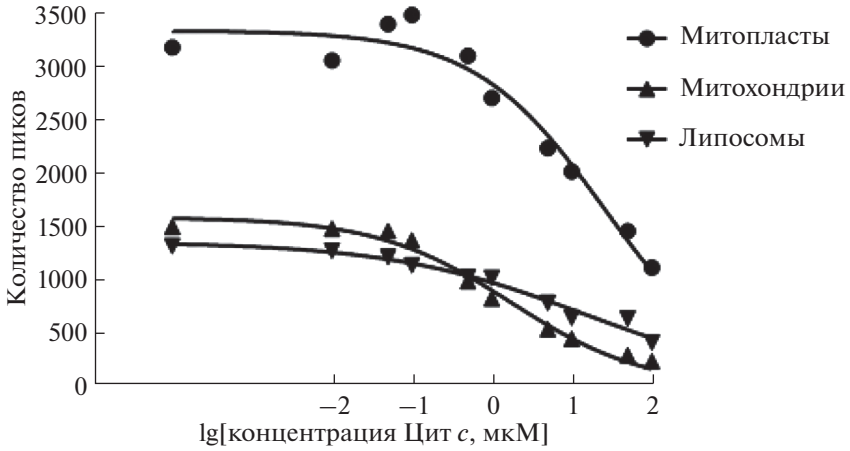


Рис. 5. Вытеснение меченого цитохрома *c* из комплекса с митопластами, митохондриями и липосомами (20% кардиолипина) немеченым цитохромом *c*. Конечная концентрация митопластов – 0.1 мг/мл, митохондрий – 0.1 мг/мл, липосом – 0.5 мг/мл, меченого цитохрома *c* – 0.26 мкМ. Измерения проводили в сахарозном буфере (180 мМ сахарозы, 10 мМ KCl, 10 мМ Tris, 10 мМ MES, pH 7.4).

для сайтов связывания на митопластах примерно в десять раз ниже, чем сродство аналогичных сайтов для митохондрий.

Также было изучено влияние ионной силы на кажущуюся константу вытеснения (K_b) и кооперативность связывания (H, табл. 1). Анализ полученных данных позволяет заключить, что в присутствии KCl кажущаяся константа вытеснения увеличивалась, что говорит о снижении сродства цитохрома *c* к липидным мембранам. Количество пиков с интенсивностью >1.4 MHz уменьшалось с ростом ионной силы раствора. В случае митохондрий и липосом при добавлении 50 мМ KCl наблюдалось многократное увеличение кажущейся константы вытеснения K_b с 2 до 29 мкМ (митохондрии) и с 17 до 88 мкМ (липосомы, табл. 1). Влияние KCl на K_b было значительно слабее в случае митопластов. Снижение связывания фЦит с кардиолипином в составе липосом при повышении ионной силы соответствует имеющимся литературным данным [22].

Определение кажущихся констант вытеснения мутантных форм цитохрома *c* с различными мембранами. Проведен эксперимент по вытеснению флуоресцентно-меченого цитохрома *c* из комплексов с липидными мембранами при помощи немеченых мутантных вариантов цитохрома *c* с единичной заменой K8T и множественными заменами K72E/E69K/K86E/K87E (4Mut), полученными в рамках наших предыдущих работ [23, 24]. Эксперимент проводили аналогично предыдущим экспериментам с титрованием комплекса фЦит/липидная мембрана немеченым белком в концентрациях от 10 нМ до 100 мкМ, при этом наблюдали характерное падение количества пиков (рис. 6).

О различиях в эффективности вытеснения меченого цитохрома *c* из комплекса фЦит/липосома (20% кардиолипин, 80% яичный лецитин) под действием немеченых мутантных вариантов цитохрома *c* свидетельствуют отличающиеся кажущиеся константы вытеснения, при том, что коэффициент Хилла примерно одинаков для всех вариантов цитохрома *c*. Основываясь на данных,

Таблица 1. Значения максимального количества пиков (B_{max}), коэффициента Хилла (H) и кажущейся константы вытеснения (K_b) немеченным цитохромом *c* дикого типа (WT), полученные после обработки кривых титрования для каждого типа изучаемых липидных мембран в присутствии и в отсутствие 50 мМ KCl

Липидная мембрана	Количество пиков, B_{max}	Коэффициент Хилла, H	Константа вытеснения, K_b, мкМ
Митопласты	3200 ± 100	–0.5 ± 0.1	25 ± 5
Митопласты + KCl	2220 ± 30	–0.6 ± 0.1	67 ± 15
Липосомы (20% кардиолипина)	1700 ± 200	–0.47 ± 0.15	17 ± 2
Липосомы (20% кардиолипина) + KCl	1240 ± 50	–6 ± 0.1	88 ± 20
Митохондрии	1750 ± 150	–0.4 ± 0.1	2 ± 0.5
Митохондрии + KCl	1800 ± 50	–0.15 ± 0.05	29 ± 5

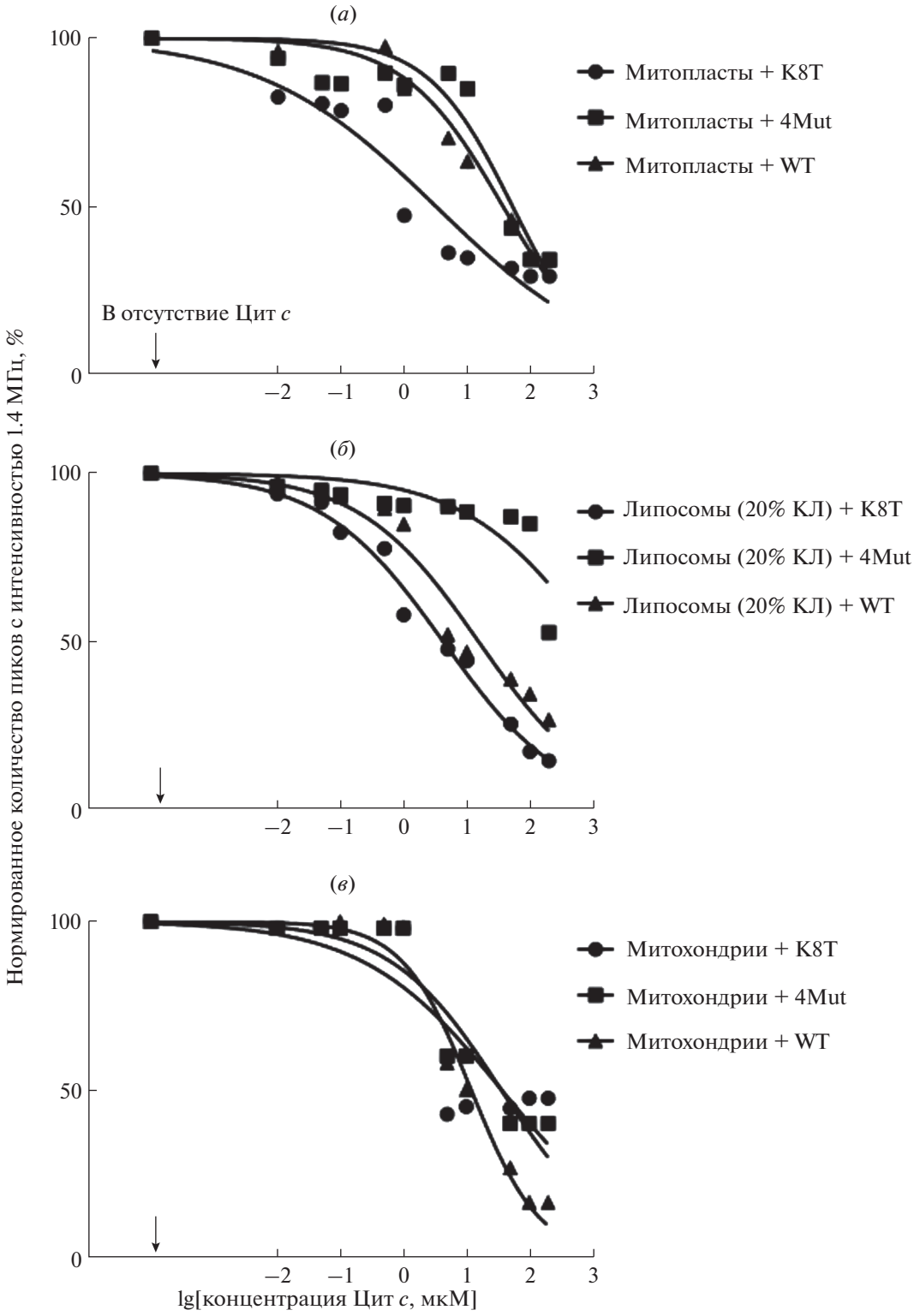


Рис. 6. Вытеснение флуоресцентно-меченого цитохрома *c* под действием немеченых мутантных вариантов K8T и 4Mut из комплексов с: (*а*) липосомами (20% кардиолипин, 80% яичный лецитин), (*б*) митопластами, (*в*) митохондриями. Графики нормированы на максимальное связывание. Измерения проводили в сахарозном буфере (180 мМ сахарозы, 10 мМ KCl, 10 мМ Tris, 10 мМ MES, pH 7.4). Концентрация митопластов – 0.1 мг/мл, митохондрий – 0.1 мг/мл, липосом – 0.5 мг/мл, меченого цитохрома *c* – 0.26 мкМ.

Таблица 2. Значения коэффициента Хилла (H) и кажущейся константы вытеснения (K_b), полученные после обработки нормированных кривых титрования в программе Prism для немеченых мутантных цитохромов *c*

Цитохром *c*	Липосомы		Митопласты		Митохондрии	
	коэффициент Хилла, H	K_b, мкМ	коэффициент Хилла, H	K_b, мкМ	коэффициент Хилла, H	K_b, мкМ
K8T	–0.45 ± 0.15	4.3 ± 1	–0.3 ± 0.15	3 ± 1	–0.4 ± 0.1	36 ± 5
K72E/E69K/K86E/K87E	–0.42 ± 0.15	1088 ± 10	–0.45 ± 0.15	52 ± 10	–0.5 ± 0.1	35 ± 5

представленных в табл. 2, можно сделать вывод, что мутантный цитохром *c* с заменой K8T, обладая повышенным сродством к кардиолипину, наиболее эффективно вытеснял флуоресцентно-меченый цитохром *c* из комплексов с кардиолипин-содержащими липосомами. В случае митопластов наблюдалась аналогичная картина. В то же время, этот белок заметно слабее связывался с митохондриями по сравнению с диким типом. Мутантный вариант K72E/E69K/K86E/K87E (4Mut) благодаря введению отрицательно-заряженных а.к.о. на позиции трех остатков Lys связывался хуже цитохрома *c* дикого типа (WT) в случае всех изучаемых типов мембран.

Согласно полученным данным, большей эффективностью связывания с митохондриями обладает цитохром *c* WT, тогда как эффективность связывания для 4Mut и K8T совпадала и была заметно ниже по сравнению с WT. Данный факт может свидетельствовать о том, что связывание цитохрома *c* с митохондриями не зависит от эффективности связывания цитохрома *c* с кардиолипином и осуществляется за счет других взаимодействий, нежели с митопластами и липосомами.

При помощи метода ФКС нами изучено взаимодействие флуоресцентно-меченого цитохрома *c* лошади с тремя видами липидных мембран: кардиолипин-содержащими липосомами, митопластами и митохондриями, полученными из препаратов печени крысы. Показано, что взаимодействие цитохрома *c* с митопластами характеризуется наибольшим количеством сайтов связывания, которые обладают, однако, меньшим сродством в сравнении с митохондриями. Поверхность мембраны митопластов состоит по большей части из внутренней митохондриальной мембраны, в липидный состав которой входит кардиолипин. Кроме того, внутренняя мембрана митохондрий содержит интегрированные в нее белковые комплексы – убихинол-цитохром *c*-оксидоредуктазу (комплекс III) и цитохром *c*-оксидазу (комплекс IV), являющиеся белками-партнерами цитохрома *c* по ЭТЦ, с которыми цитохром *c* образует временные функциональные комплексы в процессе переноса электрона. Таким образом, на митопластах имеются сайты связывания цитохрома *c* как минимум двух принципиально разных типов: 1) кардиолипин, с которым реализуется белок-липидное связывание; 2) III и IV комплексы ЭТЦ, с которыми реализуется белок-белковое связывание. По-видимому, именно этим объясняется наблюдаемое нами повышенное количество сайтов связывания на митопластах по сравнению с митохондриями. Оба рассматриваемых типа связывания цитохрома *c* реализуются с участием электростатических взаимодействий; с этим согласуются наши экспериментальные наблюдения уменьшения сродства цитохрома *c* при повышении ионной силы в среде измерения в случае комплексов с липосомами или митопластами.

Монотонное увеличение сродства фЦит к липосомам при увеличении в них процентного содержания кардиолипина свидетельствует об определяющей роли взаимодействия фЦит с кардиолипином в процессе связывания белка с кардиолипин-содержащей липосомальной мембраной.

Характер связывания фЦит с внешней митохондриальной мембраной (митохондрии) отличался от связывания с митопластами и кардиолипин-содержащими липосомами. Тем не менее, несмотря на отсутствие в составе внешней мембраны митохондрий кардиолипина и белков-партнеров ЭТЦ, связывающих цитохром *c*, в наших экспериментах наблюдалось устойчивое связывание. Таким образом, полученные нами экспериментальные данные могут свидетельствовать о наличии на внешней митохондриальной мембране специфических сайтов связывания цитохрома *c*.

Результаты эксперимента по вытеснению флуоресцентно-меченого цитохрома *c* из комплекса с липидными мембранами мутантными вариантами белка не противоречат предположению о том, что на внешней мембране митохондрий имеются специфические сайты связывания цитохрома *c*. Оба мутантных варианта одинаково эффективно (но заметно хуже по сравнению с диким типом цитохрома *c*) вытесняли флуоресцентно-меченый цитохром *c* из комплекса с митохондриями. В то же время, в случае комплексов как с липосомами, так и с митопластами вариант с заменой K8T, имеющий более высокое сродство к кардиолипину, вытеснял меченый цитохром *c* эффективнее варианта K72E/E69K/K86E/K87E и белка дикого типа.

Полученные нами данные представляют интерес с точки зрения понимания фундаментальных механизмов взаимодействия цитохрома *c* с липидными мембранами, а также влияния на эти механизмы различных внешних факторов. Понимание механизмов, в свою очередь, имеет практическую значимость, поскольку открывает широкие возможности для рационального дизайна биомедицинских препаратов, обладающих проили антиапоптотическими свойствами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали компоненты для культуральных сред и буферных растворов для хроматографии и электрофореза фирмы AppliChem (Германия); ампициллин, эндонуклеазу рестрикции *Dpn*I фирмы Fermentas (Литва), Pfu ДНК-полимеразу, кардиолипин бычьего сердца (Sigma, США), фосфатидилхолин яичного желтка (Avanti Polar Lipids, США), флуоресцентные красители сульфоцианин и BDP TMR в малеимидной форме (Lumiprobe GmbH, Германия). Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы Milli-Q (Millipore, США).

Конструирование мутантных генов цитохрома *c*. Введение мутации в ген лошадиного цитохрома *c* в составе экспрессионного плазмидного вектора pBP(CYC1) осуществляли с помощью сайт-направленного мутагенеза по методу QuikChange™ Mutagenesis Kit (Stratagene, США) [23]. После завершения реакции к смеси добавляли 10 ед. акт. рестриктазы *Dpn*I и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Далее аликвоты полученной смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* XL-1 Blue по стандартной методике. Наработку мутантной ДНК в ходе мутагенеза анализировали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. Определение нуклеотидной последовательности мутантных генов в составе плазмидной ДНК осуществляли с помощью автоматического секвенатора ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Отобранные мутантные гены переклонировали в экспрессионный вектор pBP(CYC1) [25], модифицированный для экспрессии генов лошадиного цитохрома *c* [24].

Экспрессию мутантных генов цитохрома *c* осуществляли в штамме *E. coli* JM109 в жидкой питательной среде SB с ампициллином (конечная концентрация 100 мкг/мл) без добавления индуктора при 37°C и интенсивном перемешивании в течение 22–24 ч [26]. По окончании роста клетки *E. coli* осаждали центрифугированием при 4000 *g* и 4°C в течение 20 мин. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в буфере 25 мМ Na–P_i, pH 6,0, 1 мМ NaN_3. Гомогенизацию клеток осуществляли продавливанием под высоким давлением на установке “French Press” (Spectronic Instruments, Inc., США) с последующим центрифугированием при 95000 *g* в течение 20 мин [27].

Выделение и очистку целевых белков проводили с использованием жидкостной хроматографической системы “AKTA FPLC” (GE-HEALTHCARE, США), согласно схеме, разработанной ранее [25, 27]. Клеточный экстракт наносили на катионообменную колонку MP HS 10/10 (BIO-RAD, США), уравновешенную буфером, содержащем 25 мМ Na–P_i, pH 6.0, 1 мМ NaN_3. Цитохром *c* элюировали линейным градиентом 1 M NaCl в том же буфере со скоростью 3 мл/мин. Фракции, полученные после очистки на MP HS, анализировали спектрофотометрически и при помощи электрофореза в 12% SDS-ПААГ, затем диализовали против буфера для адсорбционной хроматографии (10 мМ Na–P_i, pH 7.0, 1 мМ NaN_3) и наносили на колонку с гидроксиапатитом CHT-I (BIO-RAD, США). Цитохром *c* элюировали линейным градиентом 500 мМ Na–P_i, pH 7.0 со скоростью 2 мл/мин. Степень очистки и концентрацию цитохрома *c* в полученных фракциях определяли спектрофотометрически и при помощи электрофореза в 12% SDS-ПААГ. Степень очистки цитохрома *c* в полученных фракциях определяли по отношению оптической плотности в максимуме поглощения в области Соре к оптической плотности при 280 нм. Фракции с отношением, равным 4.5–5.0 (что соответствует чистоте коммерческого препарата ≥95%, Sigma, США), объединяли, дважды диализовали против 10 мМ аммоний-карбонатного буфера, pH 7.9, и лиофилизовали на установке ALPHA I-5.

Получение флуоресцентно-меченого цитохрома *c*. Лиофилизованный препарат мутантного варианта цитохрома *c* с заменой G56C, растворяли в реакционном буфере (10 мМ NaH_2PO_4, 200 мМ NaCl, pH 7.0) до концентрации 1–2 мг/мл. Флуоресцентный краситель – водорастворимый сульфоцианин (Sulfo-Cyanine3) в виде малеимида – растворяли в ДМСО до концентрации (0.01 мг/мл). Раствор красителя добавляли к раствору белка в соотношении 1 : 5, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 12–14 ч. Продукт реакции очищали на гель-фильтрационной колонке (Sephadex G-25), уравновешенной реакционным буфером. По окончании гель-фильтрации фракции, содержащие флуоресцентно-меченый белок, обессоливали на этой же колонке, уравновешенной бессолевым буфером (10 мМ NaH_2PO_4, pH 7.0). Количественные и качественные характеристики модифицированного цитохрома *c* определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Cary50-Bio (Varian, США) в максимумах поглощения для цитохрома *c* (412 нм), Sulfo-Cyanine3 (549 нм).

Выделение препаратов митохондрий и митопластов из печени крыс. Митохондрии печени крыс выделяли при помощи дифференциального

центрифугирования [28] в буфере, содержащем 250 мМ сахарозы, 10 мМ MOPS, 1 мМ ЭГТА и 0.1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА), pH 7.4. После центрифугирования препарат митохондрий промывали в том же буфере. Митопласты получали в процессе инкубирования митохондрий печени крысы в течение 10 мин в буфере (MOPS 10 мМ, ЭДТА 1 мМ, Tris 10 мМ, pH 7.4), содержащем 25 мМ KCl. После инкубирования суспензию центрифугировали при 4200 *g* в течение 5 мин, удаляли супернатант, а осадок суспендировали в сахарозном буфере (180 мМ сахарозы, 10 мМ KCl, 10 мМ Tris, 10 мМ MES, pH 7.4), содержащим 1 мМ ЭДТА. Выравнивание концентраций частиц митопластов и митохондрий в наших опытах достигалась тем, что при приготовлении митопластов одновременно в другую пробирку отбиралось такое же количество белка митохондрий, которое суспендировалось в том же объеме буфера, который добавлялся при последнем осаждении митопластов.

Получение кардиолипин-содержащих мультиламеллярных липосом. Для приготовления липосом 5 мг липида (яичный лецитин, кардиолипин или их смесь) растворяли в 250 мкл хлороформа. После выпаривания хлороформа в атмосфере азота добавляли 0.5 мл буфера (Tris 10 мМ, MES 10 мМ, KCl 100 мМ, pH 7.4). Полученную смесь встряхивали, после чего подвергали пяти циклам замораживания-оттаивания. По приведенной схеме были получены мультиламеллярные липосомы с содержанием кардиолипина от 1 до 5 мг.

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия. В настоящей работе был использован прибор, сконструированный на основе инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus IMT-2 (Artisan Technology Group, США) [28]. Для возбуждения красителя использовался Nd:YAG твердотельный лазер 532 нм, сопряженный с вышеупомянутым микроскопом с водноиммерсионным объективом 40×, 1.2 NA (“Carl Zeiss”, Германия). Флуоресцентный сигнал проходил через соответствующий дихроический разделитель и проецировался на сердцевину световода (50 мкм), связанного с лавинным фотодиодом (SPCM-AQR-13-FC, “PerkinElmer Optoelectronics”, Канада). Сигнал преобразовывался с помощью интерфейсной карты Flex02-01D/C (“Correlator.com”, США). Для корректной работы прибора в начале эксперимента осуществлялась настройка положения световода относительно оптической оси. Все измерения проводили при перемешивании раствора лопастевидным 3-мм пластиковым стержнем, вращающимся со скоростью 600 об./мин. Для измерения к 60 мкл сахарозного буфера (180 мМ сахарозы, 10 мМ KCl, 10 мМ Tris, 10 мМ MES, pH 7.4) добавляли БСА до конечной концентрации 0.1 мг/мл и 1–3 мкл суспензии митохондрий, митопластов или липосом. Конечная концентрация митохондриального белка в экспериментах составляла 0.2 мг/мл, а концентрация липида в случае липосом – 0.5 мг/мл. Измеряли флуктуации флуоресценции окрашенных частиц до и после добавления флуоресцентно-меченого цитохрома *c* до конечной концентрации 0.26 мкМ. Время сбора данных составляло 30 с. Флуоресценцию регистрировали из конфокального объема, расположенного примерно на 50 мкм выше поверхности покровного стекла. Перед измерениями смесь меченого белка с митохондриями (а также митопластами или липосомами) инкубировали в течение 5 мин.

В эксперименте по вытеснению флуоресцентно-меченого цитохрома *c* немеченым цитохромом *c* повторяли все вышеописанные действия, дополнительно измеряя флуктуации флуоресценции каждый раз после добавления немеченого белка (концентрации варьировались от 10 нМ до 100 мкМ).

Для количественной оценки связывания белка с липосомами и митохондриями подсчитывали количество пиков сигнала флуоресценции ($n(F > F_0)$) с интенсивностью выше некоего порога (F_0) [22] при помощи программы WinEDR Strathclyde Electrophysiology Software, разработанной Д. Демпстером из Университета Страфклида (J. Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK) или аналогичной программой Saligat, разработанной В. Козловским (НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ). В настоящей работе для оценки связывания цитохрома *c* использовался порог F_0 равный 1.4 МГц. В типичном опыте такая величина порога позволяла регистрировать около 2000 пиков, что обеспечивало достаточную статистику и хорошую воспроизводимость измерений.

Константу вытеснения и значения коэффициента Хилла рассчитывали, решая параметрическое уравнение вида: $y = (B_{max}X^H)/(K_b^H + X^H)$, где B_{max} – максимальное количество пиков, нормированное для всех измерений, X – концентрация немеченого цитохрома *c*, K_b – константа вытеснения, H – коэффициент Хилла. Для фиттирования данных этим уравнением использовали программу GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., США). Все данные были получены в результате четырех независимых экспериментов и статистически обработаны в программе GraphPad Prism 8 (Annova test), уровень значимости P был не менее 0.05.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Получение флуоресцентно меченого и мутантных вариантов цитохрома *c* осуществлялось при финансовой поддержке Программы РАН.

Изучение связывания с мембранами аналогов цитохрома *c* методом флуоресцентной корреляционной

спектроскопии проводилось при финансовой поддержке гранта РНФ № 19-74-00015 (руководитель А.М. Фирсов).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Обращение с животными и экспериментальные процедуры проводились в соответствии с международными рекомендациями по уходу и использованию животных и были одобрены комитетом по этике НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang X.* // Cell. 1996. V. 86. P. 147–157. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80085-9
2. *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.* // Nature Chem. Biol. 2005. V. 1. P. 223–232. https://doi.org/10.1038/nchembio727
3. *Kagan V.E., Borisenko G.G., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Jiang J., Potapovich A.I., Kini V., Amoscato A.A., Fujii Y.* // Free Radical Biology and Medicine. 2004. V. 37. P. 1963–1985. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.016
4. *Kagan V.E., Bayir H.A., Belikova N.A., Kapralov O., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Jiang J., Stoyanovsky D.A., Wipf P., Kochanek P.M.* // Free Radical Biology and Medicine. 2009. V. 46. P. 1439–1453. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.004
5. *Mustonen P., Virtanen J.A., Somerharju P.J., Kinnunen P.K.J.* // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 2991–2997. https://doi.org/10.1021/bi00385a006
6. *Zdzislaw S., Gordon T.* // Biophys. J. 1996. V. 71. P. 848–857. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79286-X
7. *Bradley J.M., Silkstone G., Wilson M.T., Cheesman M.R., Butt J.N.* // J. Am. Chem. Soci. 2011. V. 133. P. 19676–19679. https://doi.org/10.1021/ja209144h
8. *Shidoji Y., Hayashi K., Komura S., Ohishi N., Yagi K.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. V. 264. P. 343–347. https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1410
9. *Cuiping L., Stonestrom A.J., Christian T., Yong J., Takase R., Hou Y., Yang X.* // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 10426–10436. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.697789
10. *Capdevila D.A., Oviedo Rouco S., Tomasina F., Tórtora V., Demicheli V., Radi R., Murgida D.H.* // Biochemistry. 2015. V. 54. P. 7491–7504. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00922
11. *Kalanxhi E., Wallace C.* // Biochem. J. 2007. V. 407. P. 179–187. https://doi.org/10.1042/BJ20070459
12. *Hanske J., Toffey J.R., Morenz A.M., Bonilla A.J., Schiavoni K.H., Pletneva E.V.* // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012. V. 109. P. 125–130. https://doi.org/10.1073/pnas.1112312108
13. *O'Brien E.S., Nucci N.V., Fuglestad B., Tommos C., Wand A.J.* // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. P. 30879–30887. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689406
14. *Gorbenko G.P., Molotkovsky J.G., Kinnunen P.K.J.* // Biophys. J. 2006. V. 90. P. 4093–4103. https://doi.org/10.1529/biophysj.105.080150
15. *Younggyu Kim Sam O Ho Gassman N.R., Korlann Y., Landorf E.V., Collart F.R., Weiss S.* // Bioconjugate Chem. 2008. V. 19. P. 786–791. https://doi.org/10.1021/bc7002499
16. *Belikova N.A., Vladimirov Y.A., Osipov A.N., Karpalov A.A., Tyurin V.A., Potapovich M.V., Basova L.V., Peterson J., Kurnikov I.V., Kagan V.E.* // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 4998–5009. https://doi.org/10.1021/bi0525573
17. *Abe M., Niibayashi R., Koubori S., Moriyama I., Miyoshi H.* // Biochemistry. 2011. V. 50. P. 8383–8391. https://doi.org/10.1021/bi2010202
18. *Shimada S., Shinzawa-Itoh K., Baba J., Aoe S., Shimada A., Yamashita E., Kang J., Tateno M., Yoshikawa S., Tsukihara T.* // The EMBO J. 2017. V. 36. P. 291–300. https://doi.org/10.15252/embj.201695021
19. *Lange C., Hunte C.* // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002. V. 99. P. 2800–2805. https://doi.org/10.1073/pnas.052704699
20. *Volkov A.N., Nicholls P., Worrall J.A.* // Biochim. et Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics. 2011. V. 1807. P. 1482–1503. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2011.07.010
21. *Sinibaldi F., Fiorucci L., Patriarca A., Lauceri R., Ferri T., Coletta M., Santucci R.* // Biochemistry. 2008. V. 47. P. 6928–6935. https://doi.org/10.1021/bi800048v
22. *Antonenko Y.N., Lapashina A.S., Kotova E.A., Ramonova A.A., Moisenovich M.M., Agapov. I.I.* // The J. Memb. Biol. 2017. V. 250. P. 77–87. https://doi.org/10.1007/s00232-016-9938-6
23. *Пепелина Т.Ю., Чертков Р.В., Долгих Д.А., Кирпичников М.П.* // Биоорган. химия. 2010. Т. 36. С. 98–104. [*Pepelina T.Y., Chertkova R.V., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2010. V. 36. P. 90–96. https://doi.org/10.1134/S1068162010010097
24. *Pepelina T.Y., Chertkova R. V., Ostroverkhova T.V., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Grivennikova V.G., Vinogradov A.D.* // Biochemistry (Mosc.). 2009. V. 74. P. 625–632. https://doi.org/10.1134/S000629790906006

25. *Chertkova R.V., Brazhe N.A., Bryantseva T.V., Nekrasov A.N., Dolgikh D.A., Yusipovich A.I., Sosnovtseva O., Maksimov G.V., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P.* // PLoS One. 2017. V. 12. P. e0178280. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178280

26. *Долгих Д.А., Латыпов Р.Ф., Абдуллаев З.Х., Колон В., Родер Х., Кирпичников М.П.* // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 756–759. [*Dolgikh D.A., Latypov R. F., Abdullaev Z. K., Kolov V., Roder H., Kirpichnikov M.P.* // Russ. J. Bioorg. Chem. V. 24. P. 672–675.] https://doi.org/10.1006/prep.2001.1438

27. *Chertkova R.V., Sharonov G.V., Feofanov A.V., Bocharova O.V., Latypov R.F., Chernyak B.V., Arseniev A.S., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P.* // Mol. Cell. Biochem. 2008. V. 314. P. 85. https://doi.org/10.1007/s11010-008-9768-7

28. *Johnson D., Lardy H.* Methods in Enzymology. Academic Press, 1967. V. 10. P. 94–96.

Study of Interaction of Fluorescent Cytochrome *c* with Liposomes, Mitochondria and Mitoplasts by Fluorescence Correlation Spectroscopy

I. D. Gusev*, A. M. Firsov, R. V. Chertkova*, ***, #, E. A. Kotova**, D. A. Dolgikh*, ****, M. P. Kirpichnikov*, ****, and Y. N. Antonenko**, #**

#Phone: +7 (495) 335-28-88; e-mail: cherita@inbox.ru; antonen@belozersky.msu.ru

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

***Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/40, Moscow 119991 Russia*

****Faculty of Biology and Biotechnologies, National Research University Higher School of Economics, ul. Vavilova, 7, Moscow 117312 Russia*

*****Biology Department, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/12, Moscow, 119991 Russia*

Here, we studied the interaction of Cys-substituted (G56C) cytochrome *c* labeled with sulfocyanin-3 fluorescent dye (fCyt) with artificial and natural lipid membranes by using fluorescence correlation spectroscopy (FCS). Compared to mitochondria, mitoplasts were shown to have more fCyt binding sites with a lower affinity for this protein. The fCyt affinity for cardiolipin-containing liposomes depended on the content of cardiolipin in liposomes and decreased upon raising the ionic strength of the solution. A high value of the constant of the fCyt binding with mitochondria could be explained by the presence of specific binding sites for this protein on the mitochondrial outer membrane surface. This explanation is confirmed by observation of more efficient displacement of fluorescent cytochrome *c* by the unlabeled mutant variant K8T than by the WT protein, whereas in mitoplasts and liposomes the WT protein displaced fCyt more efficiently than K8T.

Keywords: cytochrome c, cardiolipin, mitochondria, mitoplasts, fluorescence correlation spectroscopy

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 719–728

УДК 577.218

РОЛЬ МАТЕРИНСКОГО ГЕНА *pou5f3.3/oct60* В РЕГУЛЯЦИИ НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ТКАНЕЙ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ *Xenopus laevis*

© 2020 г. Е. А. Паршина*, А. Г. Зарайский*, Н. Ю. Мартынова*, #

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

Поступила в редакцию 28.04.2020 г.
После доработки 06.05.2020 г.
Принята к публикации 16.05.2020 г.

Изучена роль материнского фактора Pou5f3.3/Oct60 шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, гомолога регулятора плюрипотентности стволовых клеток млекопитающих, белка Oct4, в раннем эмбриональном развитии. Было показано, что максимум концентрации белка Pou5f3.3/Oct60 наблюдается на стадии бластулы, а в дальнейшем происходит его деградация, стимулируемая посттрансляционными модификациями после активации генома зародыша. При помощи подхода, основанного на оверэкспрессии Pou5f3.3/Oct60 в зародышах было установлено, что этот белок активирует экспрессию ранних генов-маркеров плюрипотентности – *pou5f3.2*, *vent2.2/2.1*, *klf 4/5*, но ингибирует экспрессию генов цитоскелета и клеточной адгезии – *actin*, *claudin*, *zyxin*, *ldb3*. Кроме того, Pou5f3.3/Oct60 ингибирует экспрессию генов *ag1/2* и *agr2*, участвующих в регуляции дифференцировки регенерационной бластемы ампутированных конечностей, а также в регуляции раннего развития мозга. Учитывая консервативность ранних стадий развития у позвоночных животных, данные, полученные на зародышах *Xenopus laevis,* могут быть использованы для лучшего понимания механизмов раннего развития млекопитающих, включая человека.

Ключевые слова: эмбриогенез, *плюрипотентность*, *дифференцировка*, *транскрипционные факторы*, *POU5*, *pou5f3*.3, *мРНК*

DOI: 10.31857/S013234232006024X

ВВЕДЕНИЕ

Развитие многоклеточных животных начинается с оплодотворенного яйца или зиготы, и сначала регулируется транскриптами генов, запасенных в яйцеклетке, т.н. материнскими транскриптами. Далее происходит активация генома зародыша и контроль за развитием переходит от материнских генов к генам зародыша. До и во время активации генома зародыша судьба клеток еще не определена: каждая из клеток может развиться в любую из тканей зародыша – т.н. состояние плюрипотентности клеток. В ходе дифференцировки клетки теряют это свойство. Для правильного раннего развития необходима как пространственная разметка зародыша, так и точная временная программа перехода клеток от плюрипотентного к дифференцированному статусу.

Для зародышей амфибий, рыб и *Drosophila* материнско-зародышевый переход происходит на стадии бластулы и поэтому называется термином “Midblastula Transition” (MBT), его обычно применяют к организмам, начинающим свою жизнь с серии быстрых делений. У этих животных удлинение клеточного цикла, начало клеточных движений, деградация материнских мРНК и начало транскрипции генов зародыша (ZGA, Zygotic Gene Activation), совпадают во времени. Генетические эксперименты последних десятилетий выявили десятки генов, определяющих судьбу клеток в развитии. Большая часть этих генов кодирует эволюционно консервативные факторы транскрипции, что делает возможным использование этих животных, развитие которых протекает во внешней среде, в качестве модельных организмов для получения знаний о молекулярных механизмах, обеспечивающих точную координацию программ дифференцировки клеток разных типов, протекающих одновременно в разных частях зародыша [1].

Классическими генами плюрипотентности, известными также как маркеры стволовых клеток млекопитающих, являются гены семейства *POU*. Эти гены кодируют транскрипционные регуляторы, содержащие Pou-домен, который состоит из двух ДНК-связывающих областей: С-концевая об-

Автор для связи: (тел: +7 (916) 181-16-32; факс: +7 (495) 336-86-11; эл. почта: martnat61@gmail.com).

ласть содержит консервативный Pou-гомеодомен (POUH), а N-концевая область – уникальный Pou-специфичный домен (POUs). Обе области незаменимы для специфического связывания ДНК, при этом POUH и POUS области являются структурно независимыми доменами, соединенными гибким линкером. Такая организация доменов позволяет этим факторам участвовать в как в связывании с ДНК, так и в белок-белковых взаимодействиях. POUs домен является уникальным для POU-белков, по этому домену белки POU классифицируются на 6 семейств транскрипционных регуляторов POU1–POU6.

Белки OCT являются подсемейством POU и включают POU2, POU3 и POU5 семейства. Свое название – OCT – эти белки приобрели благодаря способности распознавать консенсусную последовательность в 8 пар нуклеотидов, называемую "октамерный мотив" [ATGC(A/T)AAT]. Известно, что 5' — область этого мотива, ATGC, связывается POU-специфичным доменом (POUs), в то время как 3'-половина сайта (A/T)AAT связана с POU-гомеодоменом (POUH). Белок OCT4 млекопитающих, кодируемый геном *Pou5f1* был первым идентифицирован как фактор, который экспрессируется в плюрипотентных клетках. Показано, что активация эндогенного фактора OCT4 необходима для индукции плюрипотентных клеток из соматических в экспериментах по перепрограммированию [1, 2]. В то же время, помимо роли в поддержании плюрипотентности в клеточных культурах было показано участие OCT4 в наиболее раннем событии дифференцировки тканей – разделение внутренней клеточной массы (inner cell mass) и трофэктодермы (trophectoderm) на эмбриональных стволовых клетках мыши [2].

Гораздо меньше изучена роль гомологов фактора OCT4 в переходе от состояния плюрипотентности к дифференцировке у низших позвоночных. Известны лишь единичные работы в этом направлении, проведенные с использованием в качестве модельного объекта эмбрионов рыбы *Danio rerio*. В частности, на этом объекте было показано, что фактор Pou 5F1, связываясь с определенными Sox-Pou сайтами в ходе активации генома зародыша, способен активировать самые ранние зиготические гены [1, 3].

Другим перспективным модельным объектом для подобных исследований являются эмбрионы шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Известно, что у шпорцевой лягушки три гена из семейства POU5: *pou5F3.1/oct91, pou5F3.2/oct25*, *pou5F3.3/oct60*, кодируют факторы Pou5F3.1/Oct91, Pou5F3.2/Oct25, Pou5F3.3/Oct60 соответственно, которые являются гомолагами OCT4 [4, 5]. Транскрипты гена *pou5F3.3/oct60* являются материнскими, запасаются в ооцитах и быстро деградируют в ходе гаструляции, при появлении активных перемещений зародышевых слоев. Кроме этого, есть данные о его экспрессии при регенерации роговицы на более поздних стадиях развития [6]. Транскрипты *pou5F3.2/oct25* частично запасаются в ооцитах, но их количество возрастает после MBT в ходе гаструляции, то есть этот ген транскрибируется начиная с поздних стадий оогенеза и до стадии нейрулы. Транскрипты *pou5F3.1/oct91* появляются только после активации генома зародыша на стадии гаструлы. Эти три гомологичных гена расположены в одном кластере и их комбинированная пространственно-временная картина экспрессии эквивалентна гену *OCT4* у мыши [2].

Поскольку самым "ранним", строго материнским геном у шпорцевой лягушки, является *pou5F3.3/oct60,* можно предположить, что его белковый продукт является тем "пусковым агентом", который участвует в инициации начальных этапов дифференцировки. В настоящей работе мы провели исследование по пространственной (методом гибридизации *in situ*) и временной экспрессии гена *pou5F3.3/oct60* (методами ОТ-ПЦР, вестерн-блоттинга и люциферазного репортерного теста) и показали, что транскрипция этого гена запускается до оплодотворения яйцеклетки на стадиях оогенеза, а трансляция достигает своего максимума у развивающегося зародыша на стадии бластулы. В ходе гаструляции количество транскриптов гена *pou5F3.3/oct60* сильно уменьшается, а белок Pou5F3.3/Oct60 в ходе гаструляции меняет свою электофоретическую подвижность, предположительно, в результате фосфорилирования и подвергается деградации. Мы показали, что оверэкспрессия фактора Pou5F3.3/Oct60 приводит к аномалиям развития эмбрионов и изучили его влияние на экспрессию некоторых генов плюрипотентности и ранней дифференцировки эмбриональных клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пространственная и временная экспрессии гена pou5F3.3/oct60

Для исследования и подтверждения временного и пространственного профиля экспрессии *pou5F3.3/oct60* мы, во-первых, методом ОТ-кПЦР показали, что в ходе развития количество транскриптов *pou5F3.3/oct60* резко падает в ходе гаструляции и остается очень низким практически до формирования всех основных тканей зародыша (рис. 1*а*), что подтверждает данные, полученные методом тотального секвенирования транскриптомов на разных стадиях развития *Xenopus laevis,* представленные в работе [7].

Во-вторых, мы подтвердили данные ПЦР методом гибридизации *in situ*. Было показано, что транскрипты этого гена диффузно расположены по поверхности зародыша с преобладанием в ани-

мальном полюсе на стадии бластулы, постепенно убывают в ходе развития, очень слабо слабо детектируются на стадии гаструлы (11–13 стадия) и практически исчезают к моменту формирования нервной трубки (нейрулы) (рис. 1*б*).

Наконец, для выяснения временного паттерна экспрессии *pou5F3.3/oct60* еще одним независимым методом мы создали люциферазную репортерную конструкцию, экспрессирующую высокочувствительную люциферазу Nanoluc (Promega) под контролем участка промотора *pou5F3.3/oct60* длиной 2454 н.п. Согласно работе [8] этот участок промотора отвечает за активацию транскрипции во время оогенеза. Созданный вектор инъецировали в ооциты или зародыши шпорцевой лягушки, которые выращивали до различных стадий развития с последующим анализом активности люциферазы Nanoluc. В результате было показано, что активация транскрипции *pou5F3.3/oct60* действительно происходит только в оогенезе и отсутствует на всех стадиях после начала дробления (рис. 1*в*).

Таким образом, мы проверили и подтвердили имеющиеся в литературе данные о материнской природе транскриптов гена *pou5F3.3/oct60,* полученные с использованием двух независимых количественных методов: ОТ-кПЦР и люциферазного репортера. Кроме этого, определили пространственные особенности экспрессии этого гена (в частности, увеличенное количество транскриптов в антериорной области при отсутствии четких границ локализации зоны экспрессии) при помощи гибридизации *in situ*. Этот метод не дает точной количественной оценки, но наглядно позволяет увидеть паттерн распределения транскриптов в целых зародышах на разных стадиях развития.

Исследование экспрессии белка Pou5F3.3/Oct60

Для изучения экспрессии белка Pou5F3.3/Oct60 важно было получить специфичные антитела, не имеющие кросс-реакции с двумя другими факторами. Согласно работе [9], наилучший результат по специфичности показал пептид 125–135 ак, расположенный в N-концевой области Pou-специфичного домена (POUs). Этот пептид в виде гибрида с GST-связывающим белком был получен в результате бактериальной экспрессии и использован для иммунизации. Этот же синтетический пептид был использован для иммобилизации на BrCN-сефарозе с целью выделения моноспецифических антител из сыворотки (см. Экспериментальную часть). Специфическая активность полученных антител в отношении белка Pou5F3.3/Oct60 была подтверждена с использованием Myc-тагированных экзогенных белков семейства *pou5* (данные не приведены).

В результате исследованияс помощью полученных антител присутствия белка Pou5F3.3/Oct60 было установлено, что после оплодотворения максимальная концентрация этого белка обнаруживается на стадии средней бластулы (7–8 стадия), т.е. перед МБТ (специфическая полоса на Вестен блоте длиной 55 кДа). Начиная со стадии средней гаструлы (стадия 11), эта полоса исчезает и начинает детектироваться полоса на уровне 65 кДа. В ходе дальнейшего развития, после гаструляции, идет ослабление и этой полосы так, что к моменту нейруляции наблюдается незначительный постоянный уровень экспрессии полосы длиной 65 кДа (рис. 1*г*).

Можно предположить, что выявленная нами смена электрофоретической подвижности Pou5F3.3/Oct60 по ходу развития, вероятно, связана с фосфорилированием этого белка на более поздних стадиях, служащим сигналом для его деградации. Действительно, ранее другими авторами было показано, что в случае мышиного гомолога Pou5F3.3/Oct60-Oct4 именно фосфорилирование является сигналом, вызывающим его протеасомную деградацию [9, 10]. При этом изменение подвижности самого Pou5F3.3/Oct60 в результате фосфорилирования наблюдали авторы работы [11]. Таким образом, можно предложить следующий механизм регуляции уровня белка Pou5F3.3/Oct60 в эмбриогенезе шпорцевой лягушки.

На стадии, предшествующей МБТ происходит накопление фактора Pou5F3.3/Oct60, необходимого для поддержания плюрипотентного состояния зародышевых клеток в начальный период эмбриогенеза. Затем, в результате включения работы генома и началом дифференцировки клеток в дифинитивные ткани, происходит фосфорилирование Pou5F3.3/Oct60, что служит сигналом к его деградации и, как следствие, к снижению его концентрации в зародыше.

Оверэкспрессия фактора Pou5F3.3/Oct60 вызывает аномалии развития и оказывает влияние на экспрессию генов плюрипотентности и генов, участвующих в регуляции эмбриогенеза и регенерации

Для оценки необходимости деградации Pou5F3.3/Oct60 для последующего развития после прохождения начальных этапов дифференцировки мы использовали подход, основанный на оверэкспрессии тагированного Myc-эпитопом Pou5F3.3/Oct60.

В результате мы наблюдали, что на ранних стадиях отклонения развития от нормы не очень заметны. Однако, на более поздних стадиях развития (после 25–30 стадии) становиться очевидны повреждения головных структур зародыша: уменьшение глаз, мозга, деформация присоски (в

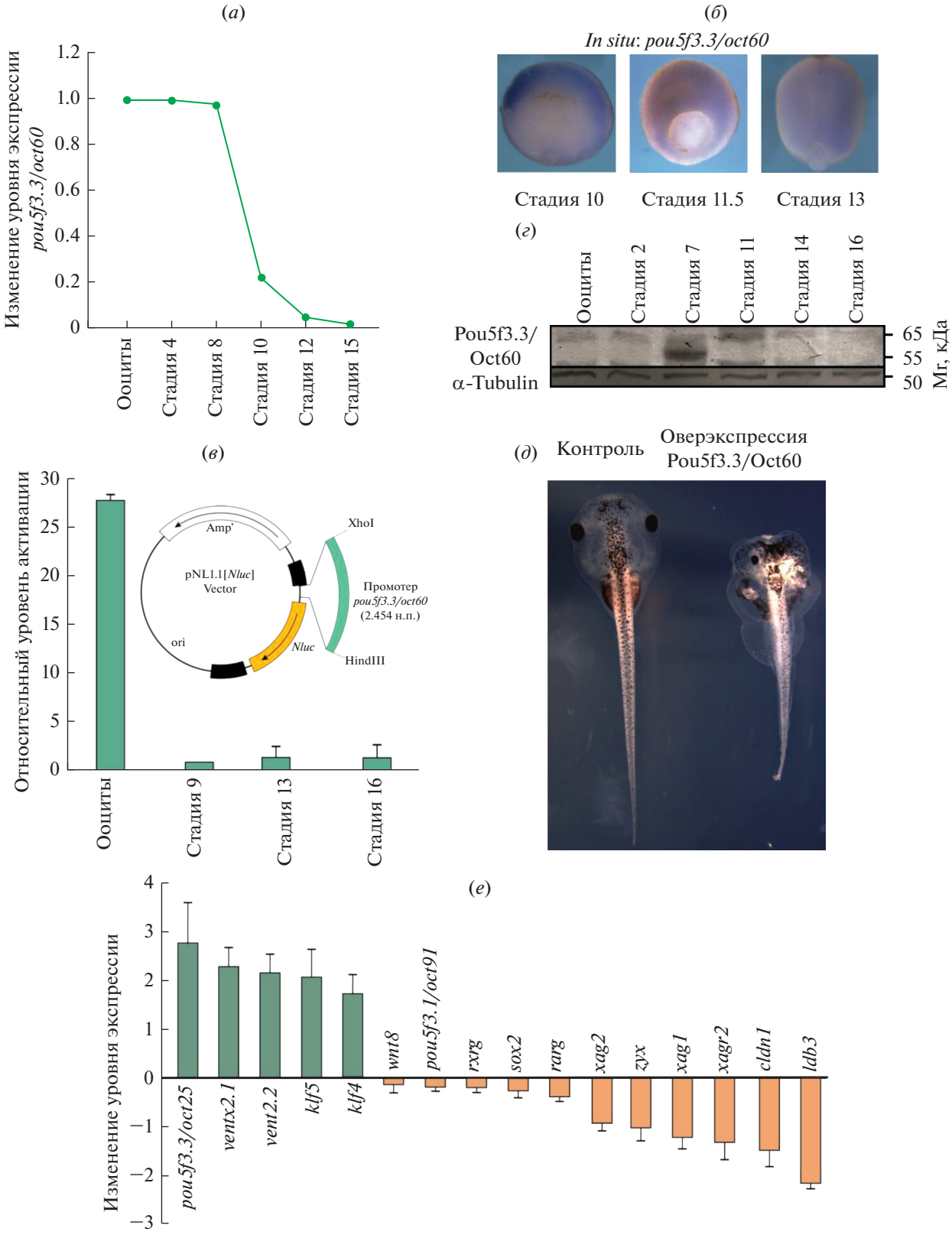

(а)
Изменение уровня экспрессии pou5f3.3/oct60
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Ооциты
Стадия 4
Стадия 8
Стадия 10
Стадия 12
Стадия 15
(б)
In situ: pou5f3.3/oct60
Стадия 10
Стадия 11.5
Стадия 13
(г)
Ооциты
Стадия 2
Стадия 7
Стадия 11
Стадия 14
Стадия 16
Pou5f3.3/
Oct60
α-Tubulin
65
55
50
Mr, кДа
(в)
Относительный уровень активации
30
25
20
15
10
5
0
Amp'
pNL1.1[Nluc]
Vector
ori
Nluc
XhoI
Промотер
pou5f3.3/oct60
(2.454 н.п.)
HindIII
Ооциты
Стадия 9
Стадия 13
Стадия 16
(д)
Контроль
Оверэкспрессия
Pou5f3.3/Oct60
(е)
Изменение уровня экспрессии
4
3
2
1
0
−1
−2
−3
pou5f3.3/oct25
ventx2.1
vent2.2
klf5
klf4
wnt8
pou5f3.1/oct91
rxrg
sox2
rarg
xag2
zyx
xag1
xagr2
cldn1
ldb3

Рис. 1. Экспрессия мРНК и белка Pou5f3.3/Oct60 в ходе эмбрионального развития. (*а*) Уровень экспрессии мРНК *pou5f3.3/oct60* во время оогенеза и эмбрионального развития по стадиям: оциты – стадия до плодотворения, стадия 4 – начало дробления, стадия 8 – бластула, стадия 10–12 – гаструла, начало клеточных движений, стадия 13–14 – ранняя нейрула, начало формирования нервной пластинки, стадия 15–16 – поздняя нейрула, начало смыкания нервной трубки. (*б*) Гибридизация *in situ* на мРНК *pou5f3.3/oct60* в нормальном развитии *X. laevis*. (*в*) Исследование активности промотора *pou5f3.3/oct60* по стадиям развития при помощи люциферазного репортерного теста. (*г*) Уровень экспрессии белка Pou5f3.3/Oct60 во время оогенеза и онтогенеза по стадиям, показанный методом вестерн блоттинга со специфическими антителами из лизатов ооцитов и зародышей на разных стадиях развития. В качестве референсного контроля использовали тубулин, детектируемый анти-тубулиновыми моноклональными антителами. (*д*) Оверэкспрессия Pou5f3.3/Oct60 приводит к дефектам развития зародышей *X. laevis* на поздних стадиях развития. (*е*) Изменение уровня экспрессии генов плюрипотентности и дифференцировки в ответ на оверэкспрессию Pou5f3.3/Oct60, показанное методом ОТ-кПЦР. Данные представлены в виде кратного изменения экспрессии генов в опытных эмбрионах по сравнению с экспрессией в контрольных эмбрионах (положительные значения – кратное усиление экспрессии, отрицательные – кратное подавление). Для нормализации данных были использованны гены *ODC* и *EF*α, показаны стандартные отклонения, полученные в результате трех независимых экспериментов.

25 случаях из 30 зародышей) и реже – укорочение оси зародыша (в 15 случаях из 30) (рис. 1*д*).

Для изучения наблюдаемых аномалий на молекулярном уровне, мы проверили, как меняется уровень транскриптов основных генов-регуляторов плюрипотентности и дифференцировки при оверэкспрессии Pou5F3.3/Oct60. Для этой цели мы провели инъекции синтетической мРНК, кодирующей тагированный Myc-пептидом Pou5F3.3/Oct60, в зародыши шпорцевой лягушки на стадии начала дробления (стадия 2х клеток). На стадии поздней гаструлы, когда согласно полученным нами данным в нормальных условиях должно происходить уменьшение транскриптов Pou5F3.3/Oct60, проводили лизис этих зародышей и анализировали экспрессию выбранных генов методом ОТ-кПЦР.

В результате было показано, что оверэкспрессия фактора Pou5F3.3/Oct60 вызывает, во-первых: усиление экспрессия генов-маркеров плюрипотентности, которые участвуют в сдерживании процесса дифференцировки. Это гены *klf4* и *klf5* семейства *KLF* (Krüppel-Like Factor-транскрипционные факторы с цинк-содержащими доменами, регуляторы плюрипотентности и дифференцировки [12]), гены *vent2.1* и *vent2.2*, кодирующие транскрипционные регуляторы – фукциональные гомологи известного маркера стволовых клеток NANOG [12], а так же фактора Pou5F3.2/Oct25 из семейства POU5.

Кроме того, было установлено, что важные для ранней дифференцировки гены, которые экспрессируются и как материнские и как зародышевые транскрипты, такие как *sox2,* рецепторы ретиноевой кислоты *rxrg u rarg*, *wnt8* меняются незначительно в сторону уменьшения. Эти гены обеспечивают начальные этапы дифференцировки, и только *sox2* рассматривается и как маркер плюрипотентности и как регулятор дифференцировки нейроэктодермы [12–14]. Так же незначительно менялась экспрессия третьего представителя *POU5* семейства, зиготического фактора Pou5F3.1/Oct91.

Наконец, мы обнаружили, что гены, отвечающие за процессы дифференцировки и экспрессирующиеся активно уже после гаструляции в значительной степени подавляются. Так, в зародышах оверэкспрессирующих Pou5F3.1/Oct91 подавлялась экспрессия генов, кодирующих белки клеточной адгезии, включая гены трансмембранных рецепторов, участвующих в межклеточных взаимодействиях и связанных с ними белков – *actin, claudin*, *zyxin, ldb3*. Кроме того, ингибировалась экспрессия генов семейства *AGR*, участвующих в регенерации и дифференцировке клеток бластемы, а так же регулирующие развитие головных структур – *ag1/2* и *agr2* [15, 16] (рис. 1*е*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Было показано, что *pou5F3.3/oct60* является материнским геном, т.е. таким геном, транскрипты которого накапливаются в ооцитах и начинают транслироваться перед стадией МБТ. Количество мРНК и белкового продукта *pou5F3.3/oct60* достигают максимума, соответственно, на стадии бластулы и ранней гаструлы. Появление фактора Pou5F3.3/Oct60 приводит к активации ранних генов развития: *pou5F3.2/oct25*, *klf4*, *klf5*, *vent2.2*, *vent2.1*, которые, с одной стороны, являются генами плюрипотентности, а с другой, участвуют в начальных этапах дифференцировки, когда в процессе гаструляции формируются основные типы зародышевых тканей. На этом этапе, когда клетки только начинают дифференцировку, важно сохранить тонкий баланс между плюрипотентностью и дифференцировкой, и только после того, как все клетки распределились по своим зародышевым листкам и готовы к образованию различных тканей, можно “включить” в них программы дифференцировки. Можно предположить, что фактор Pou5F3.3/Oct60, который присутствует в зародыше уже на самых ранних стадиях развития, селективно разрешает работу генов плюрипотентности и подавляет гены дифференцировки. Наиболее вероятной активируемой мишенью этого фактора является принадлежащий к этому же семейству ген Pou5F3.2/Oct25, который активируется в ходе гаструляции. В то же время, имеющиеся в литературе

данные о непосредственной активации транскрипции белком Pou5F3.3/Oct60 гена *pou5F3.1/oct91* [17] не подтвердились в наших экспериментах. Возможно, в активации этого гена должен участвовать каскад из факторов семейства POU5: самый ранний, материнский Pou5F3.3/Oct60 подключает зиготическую транскрипцию *pou5F3.2/oct25*, и уже фактор, кодируемый этим геном, или их комбинация активирует *pou5F3.1/oct91,* который так же является одним из наиболее ранних зиготических транскриптов [18]. Отметим, что включение всех трех факторов семейства POU5 функционально гомологично работе фактора OCT4 млекопитающих в развитии и поддержании стволового статуса клеток [18, 19].

Полученные нами данные об активации Pou5F3.3/Oct60 генов *klf4*, *klf5*, *vent2.2*, *vent2.1* являются новыми для *Xenopus laevis* и являются хорошим дополнением к имеющимся в мировом научном сообществе данным о влиянии факторов POU5 на гомологи этих генов у других модельных организмов. Так, показано, что фактор Pou5f1 может усиливать экспрессию генов *klf* на уровне транскрипции в *Danio rerio* [20, 21]. Точно так же Pou5f3.2/Oct25 может активировать экспрессию Vent2b [22]. Кроме того, недавно было показано, что активация Klf4 происходит под влиянием комплекса Pou5f3/Stat3 у японской камбалы [23].

Значительный интерес и хорошую основу для дальнейших исследований представляют также данные об ингибирующем влиянии фактора Pou5F3.3/Oct60 на экспрессию генов-участников сигнальных каскадов клеточной адгезии, *actin*, *claudin*, *zyxin*, *ldb3*, и генов-регуляторов раннего развития мозга и регенерации *ag1/2* и *agr2.* Ранее другими авторами было показано, что подавление активности генов клеточной адгезии может происходить при участии двух других факторов семейства POU5. При этом влияние генов этого семейства на регулирование адгезии происходит как на транскрипционном, так и на посттрансляционном уровне – в результате белковых взаимодействий с факторами транскрипции [24]. В ходе дальнейших исследований предстоит выяснить, какие из этих механизмов ответственны за наблюдаемые эффекты ингибирования этих генов белком Pou5F3.3/Oct60.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение векторов, использованных в работе

Стратегии создания ДНК конструкций описаны в табл. 1.

Получение синтетической мРНК и микроинъекции мРНК в зародыши

мРНК *6myc-pou5f3.3/oct60* была синтезирована на линеаризованной рестриктазой *Not*1 плазмиде *pCS2MT-pou5f3.3* с использованием коммерческого набора Ambion SP6 mRNA Mtssage Machine. После синтеза мРНК очищали при помощи набора CleanRNA Standard (Евроген). Экспрессия тагированного белка 6myc- Pou5f3.3/Oct60 в эмбрионах была подтверждена при помощи иммуноблоттинга с анти-myc моноклональными антителами (Sigma).

Зародышей *Xenopus* получали в результате оплодотворения *in vitro* и растворяли оболочки в 2% цистеине при pH 7.8 мРНК *6myc-pou5f3.3/oct60* смешивали с флуоресцеин-лизин-декстраном (FLD, Invitrogen, 40 кДа, 5 мкг/мкл) и микроинъецировали (250 нг/бластомер) в эмбрионы *Xenopus laevis* на стадии 2-х бластомеров в один или оба, в зависимости от целей эксперимента, в 0.1 × MMR с 4% фиколлом по методике, представленной в работе [25].

Гибридизация in situ

Для синтеза антисмслового зонда к *pou5f3.3/oct60* использовали набор mMessage mMachine SP6 (Ambion) и digNTP. Гибридизацию *in situ* всех эмбрионов с антисмысловыми dig-зондами к *pou5f3.3/oct60* проводили по стандартной методике [26] с небольшими дополнениями [27, 28].

Выделение тотальной РНК из эмбрионов Xenopus laevis, получение кДНК и ОТ-кПЦР

Выделение тотальной РНК из эмбрионов *Xenopus laevis* проводили на стадии нейрулы (стадия 13) с использованием реагента ExtractRNA (Evrogen) и набора CleanRNA (Evrogen) в соответствии с инструкциями производителя кДНК синтезировали с использованием набора MMLV RT (Evrogen) из 250 нг РНК образца, а ПЦР проводили с помощью qPCRmix-HS SYBR (Evrogen). ОТ-кПЦР проводили в амплификаторе DTPrime 4 qPCR (DNA-Technology) по методике, представленной в работе [29].

Используемые нами праймеры перечислены в табл. 2.

Анализ люциферазной активности

Для исследования промоторной активности плазмиду pNL1.1-pr *pou5f3.3* L (62.5 пг/ооцит или 12.5 пг/бластомер) смешивали с контрольной плазмидой pRL-TK-Renilla (250 пг/ооцит или 50 пг/бластомер) и микроинъецировали в ооциты или эмбрионы *Xenopus laevis* на стадии 2-х бластомеров. Ооциты инкубировали в течение суток при температуре 18°C, эмбрионы – до

Таблица 1. Векторные конструкции полученные в ходе работы

ДНК-конструкция	ПЦР-праймеры и стратегия клонирования
pAL2-T-pou5f3.3	ПЦР с тотальной кДНК Прямой праймер: atgc gaattcaATGGACCAGCCCATATTGTA Обратный праймер: atgc ctcgag TCAGCCGGTCAGGACCCC Полученный ПЦР-фрагмент был клонирован в pAL2-T Vector (Evrogen) В полученной конструкции кодирующая последовательность pou5f3.3 располагается перед промотором sp6, что позволяет синтезировать антисмысловой зонд
pNL1.1-pr pou5f3.3.L	ПЦР с ДНК *X. laevis* Прямой праймер: atgc ctcgag ATTTTATGCTTCCAGGATGTAAGC Обратный праймер: atgc aagctt AACTCTTCCAACCCAAGGCCTG Клонирование в pNL1.1 vector (Promega) по сайтам рестрикции XhoI-HindIII
pGEX4T1-pou5f3.3.L126-136aa	Вставка была получена отжигом двух праймеров: Прямой праймер: AATTCTGGCATTATCCCTCCTGGCAGCAGGGGAACCTAc Обратный праймер: tcgagtaggttcccctgctgccaggagggataatgccag Клонирование в плазмиду pGEX4T1 pCS2MT по сайтам рестрикции EcoRI-XhoI
pCS2MT-pou5f3.3	ПЦР с плазмиды pAL2-T-pou5f3.3 Прямой праймер: atgc gaattcaATGGACCAGCCCATATTGTA Обратный праймер: atgc ctcgag TCAGCCGGTCAGGACCCC Полученный ПЦР-фрагмент был клонирован в pCS2MT по сайтам рестрикции EcoRI-XhoI

необходимой стадии. Затем ооциты и эмбрионы собирали, лизировали и измеряли активность люциферазы с помощью наборов Nano-Glo kit (Promega) и Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) по протоколу производителя. Для каждого из образцов подсчитывали отношение активности люциферазы Nanoluc к активности контрольной люциферазы Renilla. При описании результатов люциферазного теста за условную единицу принималось отношение активностей на стадии 9.

Получение специфических антител к Pou5f3.3/Oct60, гель-электрофорез и иммуноблоттинг

Антитела к Pou5f3.3/Oct60 получали против фрагмента, содержащего аминокислотные остатки 125–136 (WHYPSWQQGNLK). Соответствующую вставку клонировали в вектор pGEX-4T, как описано в табл. 1, экспрессировали в штамме DH-5α *Escherichia coli* DH-5α, адсорбировали на глутатион-агарозе (Sigma) из бактериальных лизатов, промывали PDB (Pull-Down Buffer: 25 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 175 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA, 5% глицерин, 0.5% NP-40, коктейль ингибиторов протеаз (Sigma)), элюировали 50 мМ восстановленного глутатиона и использовали для иммунизации кролика. Антитела из сыворотки выделяли на аффинной колонке, в которой синтетический пептид, соответствующий 125–136 а.а. белка Pou5f3.3/Oct60 был иммобилизован на BrCN-сефарозе (Sigma). Аффинную очистку моноспецифических антител проводили, как описано в [25]. Уровень эндогенного белка Pouf3.3/Oct60 измеряли по методике [29] на лизатах ооцитов или эмбрионов *Xenopus* и с помощью SDS-PAGE электрофореза с последующим вестерн-блоттингом с детектированием антител против Pou5f3.3/Oct60. Вторичные антитела представляли собой козий анти-кроличий F (ab') фрагмент, конъюгированный с щелочной фосфатазой (Sigma). Стабилизированный субстрат Western Blue (Promega) использовали для обнаружения антител, конъюгированных щелочной фосфатазой.

Статистические методики, использованные для анализа достоверности данных

Для проверки статистической достоверности данные ОТ-кПЦР, полученные от трех независимых экспериментов, были импортированы в Microsoft Excel и проанализированы с использованием метода ΔΔCt [30]. Для нормировки уровня экспрессии генов в качестве внутреннего контроля исполь-

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидов (праймеров), использованных для анализа экспрессии исследуемых факторов (с их индентификационными номерами в системе PubMed–NCBI) методом кПЦР с указанием длины амплифицированного фрагмента

№	Название гена	Идентификационный номер белка в NCBI	Последовательность праймера	Длина амплификата, н.п. (нуклеотидных пар)
1	Elongation factor 1 Alpha (*EF*-α)	NP_001080911	Прямой: GTTCATTTACCGCACAGGTTATCA Обратный: ACACAGGGGCATATCCAGCA	70
2	Ornithine decarboxylase 1 (*ODC*)	NP_001080167.1	Прямой: GCCAGTTCTAACAAAGAAACCCA Обратный: TCTACGATACGATCCAGCCCA	93
3	Pou class 5 homeobox 3, gene3 (*pou5f3.3*)	NP_001081583.1	Прямой: CACAAAACTGGACTTACTGGGG Обратный: TCTCAACTGCCCTTACCTTCTC	70
4	Pou class 5 homeobox 3, gene 2 (*pou5f3.2*)	NP_001079832	Прямой: CCCTGTTGGACACTATGCG Обратный: CCCTGTTGGACACTATGCG	113
5	Xvent-2B protein (*ventx2.1*)	NP_001081607.1	Прямой: GCACCGCAGCCCAC Обратный: GGAGTTGAAGGGAGTCAGG	141
6	Xbr-1a/xvent2 protein (*ventx2.2*)	NP_001080931	Прямой: CAACAGCACCTTGGGC Обратный: CTGCGGGAGGACAGAAGTC	125
7	Kruppel-like factor 5 (*klf5*)	NP_001090064.1	Прямой: ACTACCCTGGTAAGAACCTACA Обратный: CCCTTTTCCCCATGACAGGA	132
8	Kruppel-like factor 4 (*klf4*)	NP_001079828.1	Прямой: ATGAACCGACCCGCCAC Обратный: AAGCTCGATCACATCGCTGA	171
9	Xwnt-8 protein (*wnt8*)	AAH82627.1	Прямой: GCACAGTCAAATGCGAGCAA Обратный: AAACAAATCCACTGGCCCGA	167
10	Pou class 5 homeobox 3, gene1 (*pou5f3.1*)	AFU51783.1	Прямой: ATTAGGGAGAATGGCGGGGA Обратный: CAGTGGGACCGTGGGAAAAA	117
11	Retinoid X receptor gamma (*rxrg*)	NP_001088948	Прямой: AGCATTTGGAGACGCTGGAT Обратный: TGCTCGCAGCAGAATGACTT	160
12	SRY-box 2 (*sox2*)	NP_001081691.1	Прямой: GCTGTGGCGGGAGAGAGAAAGT Обратный: TGGTTGTTGGACGCAGAGTTGGA	178
13	Retinoic acid receptor gamma (*rarg*)	NP_001081663.1	Прямой: GTCGACGAAGGCCTGACAAA Обратный: GAATCAGCGGAGGCATAGGT	141
14	Anterior gradient 2 (*xag2*)	NP_001081669.1	Прямой: TGCTGCCAAGTCTGAGCCTGC Обратный: TCCTGAGCCAGTTTCTGTGCCA	227
15	Zyxin (*zyx*)	NP_001092151.1	Прямой: CATTTAAGGCCCCGGAAGAGC Обратный: TGGGAATGAACCACCAGAGG	245
16	Anterior gradient 1 (*xag1*)	NP_001079667.1	Прямой: GCAGGAACAACTGATACCAAAACT Обратный: GGACAATCTTCCAGGTGGTG	182
17	Anterior gradient 2 (*xagr2*)	NP_001079720.1	Прямой: TGGCCAGTATGTTCCCAAGGTTGT Обратный: CATCACTTTAGCATACACCTCCGC	238
18	Claudin 1 (*cldn1*)	NP_001079445.1	Прямой: TCTTCACAAAACCCACACCCT Обратный: ACCATGATTGCTGTTGCTAGT	150
19	LIM domain binding 3 (*ldb3*)	NP_001080237.1	Прямой: CTCCAGTGTATCAGGCGGTG Обратный: GGGCTGTTACGTTCCGTTTC	199

зовали уровень экспрессии гена фактора элонгации EF-1α и орнитин-декарбоксилазы (ODC) согласно работе [31] уровни экспрессии которых в данных экспериментальных условиях считались неизменными.

Эксперименты по анализу изменений в экспрессии Pou5f3.3/Oct60 на проявленных специфическими антителами PVDF мембранах проводили в более чем 5-кратном повторении.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках научного проекта РФФИ № 18-04-00674 а. Эксперименты по определению люциферазной активности были выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90017. Эксперименты по ОТ-кПЦР для генов *ag1/2* и *agr2* были выполнены при поддержке проекта РФФИ № 20-04-00675 а. Эксперименты по иммуноблоттингу проводили при поддержке проекта РНФ № 19-14-00098.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит исследований с использованием людей в качестве объектов исследования. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Onichtchouk D.* // Biochimica et Biophysica Acta. 2016. V. 1859. P. 770–779. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2016.03.013
2. *Cao Y.* // Cell & Bioscience 2013. V. 3 P. 15. https://doi.org/10.1186/2045-3701-3-15
3. *Leichsenring M., Maes J., Mössner R., Driever W., Onichtchouk D.* // Science. 2013. V. 341. P. 1005–1009. https://doi.org/10.1126/science.1242527
4. *Hinkley C.S., Martin J.F., Leibham D., Perry M.* // Mol. Cell. Biol. 1992. V. 12. P. 638–649. https://doi.org/10.1128/mcb.12.2.638
5. *Whitfield T., Heasman J., Wylie C.* // Dev. Biol. 1993. V. 155. P. 361–370. https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1035
6. *Kimberly J.P., Alvin G.T., Jonathan J.H.* // Developmental Biology. 2013. V. 374. P. 281–294. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.005
7. *Briggs J.A., Weinreb C., Wagner D.E., Megason S., Peshkin L., Kirschner M.W., Klein A.M.* // Science. 2018. V. 360. P. 6392. https://doi.org/10.1126/science.aar5780
8. *Morichika K., Sugimoto M., Yasuda K., Kinoshita T.* // Zygote. 2014. V. 22. P. 266–274. https://doi.org/10.1017/S0967199412000536
9. *Whitfield T.T., Heasman J., Wylie C.C.* // Dev. Biol. 1995. V. 169. P. 759–769. https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1185
10. *Lippok B., Sungmin Song S., Driever W.* // Dev. Dyn. 2014. V. 243. P. 468–477. https://doi.org/10.1002/dvdy.24079
11. *Bae K.B., Yu D.H., Lee K.Y., Yao K., Ryu J., Lim D.Y., Zykova T.A., Kim M.O., Bode A.M., Dong Z.* // Stem Cell Reports. 2017. V. 9. P. 2050–2064. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.10.017
12. *Cao Y.* // Sci. China Life Sci. 2015. V. 58. P. 336–342. https://doi.org/10.1007/s11427-015-4799-2
13. *Dollé P.* // Nucl Recept Signal. 2009. V. 12. P. 006. https://doi.org/10.1621/nrs.07006
14. *Chu C.W., Sokol S.Y.* // Elife. 2016. V. 23. P. e16463. https://doi.org/10.7554/eLife.16463
15. *Tereshina M.B., Ermakova G.V., Ivanova A.S., Zaraisky A.G.* // Biol. Open. 2014. V. 15. P. 192–203. https://doi.org/10.1242/bio.20147401
16. *Ivanova A.S., Tereshina M.B., Ermakova G.V., Belousov V.V., Zaraisky A.G.* // Sci. Rep. 2013. V. 3. P. 1279. https://doi.org/10.1038/srep01279
17. *Exner C.R.T., Kim A.Y., Mardjuki S.M., Harland R.M.* // Dev. Biol. 2017. V. 425. P. 33–43. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.03.015
18. *Venkatarama T., Lai F., Luo X., Zhou Y., Newman K., King M.L.* // Development. 2010. V. 137. P. 651–660. https://doi.org/10.1242/dev.038554
19. *Morrison G.M., Brickman J.M.* // Development. 2006. V. 133. P. 2011–2022. https://doi.org/10.1242/dev.02362
20. *Onichtchouk D., Geier F., Polok B., Messerschmidt D.M., Mössner R., Wendik B., Song S., Taylor V., Timmer J., Driever W.* // Molecular Systems Biology. 2010. V. 6. P. 354. https://doi.org/10.1038/msb.2010.9
21. *Kotkamp K., Mössner R., Allen A., Onichtchouk D., Driever W.* // Dev. Biol. 2014. V. 385. P. 433–447. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.10.025
22. *Cao Y., Knochel S., Donow C., Miethe J., Kaufmann E., Knochel W.* // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 43735–43743. https://doi.org/10.1074/jbc.M407544200
23. *Sun Y., Liu J.,Wang B., Liu X., Du X., Liu Y., Zhang Q.* // Gene. 2019. V. 687. P. 56–63. https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.029
24. *Livigni A., Peradziryi H., Sharov A.A., Chia G., Hammachi F., Portero Migueles R.P., Sukparangsi W., Pernagallo S., Bradley M., Nichols J., Ko M. S.H., Brickman J.M.* // Current Biology. 2013. V. 23. P. 2233–2244. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.048
25. *Martynova N.Y., Eroshkin F.M., Ermolina L.V., Ermakova G.V., Korotaeva A.L., Smurova K.M., Zaraisky A.G.* // Dev. Dyn. 2008. V. 237. P. 736–749. https://doi.org/10.1002/dvdy.21471

26. *Harland R.M.* // Methods. Cell. Biol. 1991. V. 36. P. 685–695. https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)60307-6

27. *Ерошкин Ф.М., Байрамов А.В., Ермакова Г.В., Зарайский А.Г., Мартынова Н.Ю.* // Биоорган. химия. 2018. Т. 44. С. 303–316. [*Eroshkin F.M., Bayramov A.V., Ermakova G.V., Zaraisky A.G., Martynova N.Y.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 310–321.] https://doi.org/10.1134/S1068162018030032

28. *Мартынова Н.Ю., Ерошкин Ф.М., Зарайский А.Г.* // Биоорган. химия. 2018. Т. 44. С. 353–356. [*Martynova, N.Y., Eroshkin, F.M., Zaraisky, A.G.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 362–365.] https://doi.org/10.1134/S106816201803010X

29. *Мартынова Н.Ю., Паршина Е.А., Ерошкин Ф.М., Зарайский А.Г.* // Биоорган. химия. 2020. Т. 46. С. 396–403. [*Martynova N.Y., Parshina E.A., Eroshkin F.M., Zaraisky A.G.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 530–536.] https://doi.org/10.1134/S1068162020040147

30. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

31. *Иванова А.С., Короткова Д.Д., Мартынова Н.Ю., Аверьянова О.В., Зарайский А.Г., Терешина М.Б.* // Биоорган. химия. 2018. Т. 44. С. 348–352. [*Ivanova A.S., Korotkova D.D., Martynova N.Y., Averyanova O.V., Zaraisky A.G., Tereshina M.B.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 358–361.] https://doi.org/10.1134/S106816201803007X

Role of Pou5f3.3/Oct60 in the Regulation of Initial Stages of Tissues Differentiation in the *Xenopus laevis* Embryogenesis

E. A. Parshina*, A. G. Zaraisky*, and N. Y. Martynova*,#

#Phone: +7 (916) 181-16-32; fax: +7 (495) 336-36-22; e-mail: martnat61@gmail.com

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

The present work is devoted to the study of the role of the maternal factor Pou5f3.3/Oct60 of the *Xenopus laevis* homolog of the mammalian stem cell pluripotency regulator, Oct4, in the early embryonic development. It was shown that the maximal concentration of the Pou5f3.3/Oct60 protein is observed at the blastula stage, and then its degradation begins been stimulated by post-translational modifications after activation of the embryo genome. Using an approach based on the overexpression of Pou5f3.3/Oct60 in embryos, it was found out that this protein stimulates the expression of early pluripotency marker genes, *pou5f3.2, vent2.2/2.1, klf 4/5,* but inhibits the expression of cytoskeletal and cell adhesion genes: *actin, claudin, zyxin, ldb3.* In addition, Pou5f3.3/Oct60 inhibits the expression of the *ag1/2* and *agr2* genes, which are involved in the regulation of differentiation of the regenerative blastema of amputated limbs, as well as in the regulation of early brain development. Given the conservatism of the early stages of development in vertebrates, the data obtained on the embryos of *Xenopus laevis* can be used to better understand the mechanisms of the early development in mammals, including humans.

Keywords: embryogenesis, *pluripotency*, *differentiation*, *transcription factors*, *POU5*, *pou5f3.3*

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 729–735

УДК 577.121.2:577.121.3:591.134:597.552.5

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ НА ПРОТЕИНАЗЫ И РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КУЛЬТИВИРУЕМОЙ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ *O. mykiss*

© 2020 г. Н. П. Канцерова*, #, М. В. Чурова*, Л. А. Лысенко*, Е. Д. Тушина*, М. А. Родин*, М. Ю. Крупнова*, И. В. Суховская*

**Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ "Карельский научный центр Российской академии наук", Россия, 185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11*

Поступила в редакцию 18.04.2020 г.
После доработки 24.04.2020 г.
Принята к публикации 28.04.2020 г.

Оценен уровень экспрессии генов некоторых структурных и регуляторных мышечных белков, а также активность основных внутриклеточных протеиназ (кальпаинов, протеасом) у садковой радужной форели в благоприятные для роста периоды и в условиях гипертермии. Интенсивный рост рыб сопровождался высокой транскрипционной активностью гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*) при сдерживающем влиянии миостатина, высокой скоростью обмена белков и стабильным уровнем миогенных регуляторных факторов MyoG и MyoD1b. Торможение роста форели в период летнего повышения температуры воды было сопряжено со снижением уровня экспрессии гена миозина, основного белка миофибрилл. В условиях гипертермии также снижалась протеолитическая активность кальпаинов и протеасом, определяющих уровень белковой деградации в мышцах и тем самым регулирующих интенсивность накопления в них белка и ростовых процессов в целом. Таким образом, изменения интенсивности синтеза миофибриллярных белков, миогенеза и белковой деградации у радужной форели в благоприятные для роста периоды и в условиях гипертермии происходят сопряженным образом, что подтверждает взаимосвязь этих процессов.

Ключевые слова: миозин, миогенные регуляторные факторы, кальпаины, протеасомы, рост, радужная форель, гипертермия

DOI: 10.31857/S0132342320060111

ВВЕДЕНИЕ

Большинство костистых рыб (кл. Teleostei) характеризуется недетерминированным ростом, скорость которого главным образом зависит от интенсивности запасания структурных белков скелетных мышц, на долю которых приходится до 40% всего синтезируемого белка [1, 2]. Продемонстрирована четкая взаимосвязь уровня экспрессии гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*), основного белка миофибрилл, с темпами роста радужной форели [3], атлантического лосося [4], пятнистой зубатки [5], светлоперого судака [6] и рыб других видов, в связи с чем он используется для количественной оценки ростовых процессов [4]. Постэмбриональный мышечный рост у рыб осуществляется по двум путям – гиперплазии (образования новых волокон) и гипертрофии (увеличения размера волокон) [7] – под контролем специфических миогенных регуляторных факторов (myogenic regulatory factors, MRF) – транскрипционных факторов семейства bHLH (basic helix-loop-helix) [8]. К ним относятся MyoD, Myf5, миогенин (MyoG) и MRF4. MyoD и Myf5 вовлечены в процесс детерминации мышечных клеток, а миогенин и MRF4 – их дифференцировки. Важным отрицательным регулятором миогенеза является миостатин (MSTN), белок семейства трансформирующих ростовых факторов TGF-β, ингибирующий как пролиферацию, так и дифференцировку мышечных клеток [8].

Биосинтетические процессы в мышцах контролируются белок-деградирующей системой, включающей лизосомально-аутофагический, кальпаиновый и протеасомный пути [9, 10] и имеющей у рыб свои особенности [11, 12]. К настоящему моменту охарактеризована роль указанных ферментных систем и их относительный вклад в общую деградацию белков скелетных мышц в процессе роста рыб, на разных стадиях их жизненного и годового цикла, при различных физиологических состоя-

Сокращения: п.о. – пар оснований; PMSF – фенилметилсульфонилфторид.

Автор для связи: (тел.: +7 (8142) 76-98-10; факс: +7 (8142) 76-98-10; эл. почта: nkantserova@yandex.ru).

Таблица 1. Масса, длина и темп роста (за период между текущей и предыдущей датой взятия материала) радужной форели

Дата	Масса, г	Длина, см	Темп роста, % массы/день
12.05.2018	817.1 ± 166.8	38.4 ± 2.62	–
27.06.2018	1095.4 ± 194.1	41.6 ± 1.87	0.074
17.07.2018	1471.6 ± 308.4	44.7 ± 3.35	0.172
24.08.2018	1777.1 ± 181.7	46.7 ± 1.92	0.053
18.09.2018	1947.3 ± 314.7	49.9 ± 2.38	0.038

ниях [12–18]. В периоды интенсивного роста у рыб наблюдается максимальная скорость как биосинтеза структурных мышечных белков, так и белкового распада, обеспечивающего контроль качества синтезируемых полипептидов и элиминацию молекул с ошибками биосинтеза, нефункциональных, избыточных и стадиеспецифичных. В процессе белкового гидролиза образуются свободные аминокислоты – структурные элементы для синтеза новых белков.

Скорость роста рыб может тормозиться внешними воздействиями, в частности, для холодолюбивой радужной форели, *Oncorhynchus mykiss* Walb., критичен летний подъем температур, приводящий к снижению темпов ее роста, подверженности бактериальным инвазиям, повышению процента летальности. Цель настоящего исследования – изучение отклика показателей мышечного роста, включая уровни экспрессии генов структурных (*MyHC*) и регуляторных мышечных белков (*MyoD*, *MyoG*, *MSTN*) и активность основных внутриклеточных протеиназ (кальпаинов, протеасом), у садковой радужной форели при повышении температуры воды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика роста радужной форели

Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о линейном приросте живой массы и длины культивируемой форели на протяжении выростного сезона. В период повышенных температур воды с 17 июля по 22 августа (средняя температура 19.8°C, в отдельные дни достигающая 22°C) наблюдалось снижение темпа роста форели до 0.053 против 0.172, характеризующих период температурного оптимума, который составляет для форели 14–19°C [19]. Метаболизм форели и темпы ее роста так же, как у всех пойкилотермных животных, в значительной степени определяются температурой среды обитания (при достаточном количестве пищи и растворенного кислорода). Повышение температуры до 22–23°C вызывает метаболическую депрессию, проявляющуюся умеренным, а до 24–25°C – резким снижением темпа роста форели [19].

Экспрессия генов мышечных белков радужной форели

Для оценки синтетической активности в мышцах радужной форели использовали уровень экспрессии гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*) (рис. 1*а*). С началом периода подъема температуры воды от 13–14 до 17.5°C (июль) и выше (август) уровень экспрессии *MyHC* у форели достоверно снизился и лишь частично восстановился вне периода гипертермии (сентябрь). Аналогичное снижение экспрессии *MyHC* при повышении температуры воды было показано у пятнистой зубатки [5].

Для выяснения регуляторных механизмов температурной зависимости роста скелетных мышц была оценена экспрессия генов транскрипционных факторов регуляции миогенеза (MRF) – MyoD и миогенина. Высококонсервативный bHLH регион этих транскрипционных факторов [20] связывается с последовательностью E-box, обнаруживаемой в промоторе генов многих мышечных белков [21]. *MyoD* экспрессируется, как правило, в пролиферирующих миобластах, тогда как экспрессия миогенина наблюдается в постмитотических мышечных клетках. Появление транскриптов *MyoD* и *Myf5* в пролиферирующих миобластах сопровождается повышением экспрессии миогенина, который, в свою очередь, необходим для усиления и поддержания транскрипционной активности генов структурных и сократительных мышечных белков [8]. При этом процессы гиперплазии ассоциированы главным образом с экспрессий *MyoD*, а гипертрофии – с экспрессией миогенина [22]. Как было ранее показано на диких и аквакультурных видах лососевых, экспрессия MRF зависит преимущественно от температуры среды [23], состава корма и режима кормления [24, 25].

Динамика экспрессии *MyoG* и *MyoD1b* (наиболее многочисленного паралога *MyoD* в белых скелетных мышцах рыб; [26]) представлена на рис. 1*б* и 1*в*. Коэффициент корреляции уровней экспрессии этих генов составил 0.58 ($p < 0.05$). Аналогичный сопряженный характер изменения уровня экспрессии *MyoG* и *MyoD* в онтогенезе ранее был описан у радужной форели [22], атлантического лосося [27], паку [28]. Известно, что *MyoD* активирует экспрессию миогенина, напрямую связываясь с его регуляторными элементами [28, 29].

Динамика экспрессии миостатина, антагониста мышечного роста, носила отличный от прочих регуляторов миогенеза характер (рис. 1*г*). Низкий уровень экспрессии миостатина у форели в благоприятный для роста период выхода из зимовального голодания (май), вероятно, является од-

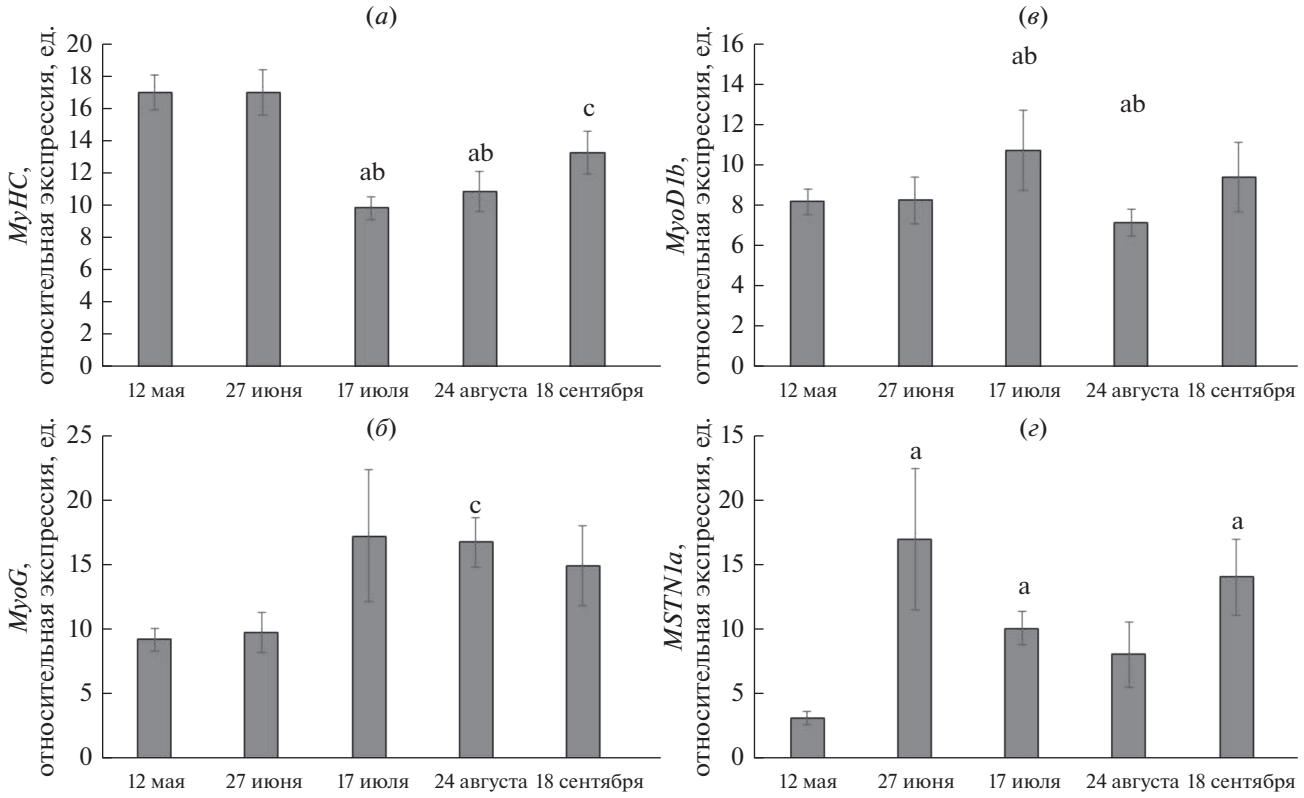


Рис. 1. Уровень экспрессии *MyHC* (*а*), *MyoG* (*б*), *MyoD1b* (*в*), *MSTN1a* (*г*) в скелетных мышцах радужной форели. a – различия достоверны по сравнению с 12 мая, b – по сравнению с 27 июня, c – по сравнению с 17 июля.

ним из факторов, способствующих интенсивному синтезу белка, включая изученный нами миозин (рис. 1*а*), и мышечному росту в целом. Значимая активация экспрессии *MSTN1a* в ответ на высокий уровень синтеза мышечного белка и поддерживающих его миогенных регуляторных факторов (июнь), вероятно, служит механизмом контроля процессов гиперплазии и гипертрофии с целью предотвращения бесконтрольного роста мышц [22].

Интенсивность протеолиза в скелетных мышцах радужной форели

Более интенсивный рост форели в период оптимальных температур (июнь) сопровождался, по нашим данным, повышенной активностью протеолитических систем, отвечающих за обмен и контроль качества белка. В период высоких температур наблюдалось снижение их активности, которое составило 30% для кальпаинов и 40% для химотрипсинподобной активности протеасом. Уровень активности внутриклеточных протеиназ нелизосомального пути белкового распада в скелетных мышцах радужной форели демонстрирует также сезонную динамику (рис. 2*а*, 2*б*), постепенно снижаясь по ходу выростного сезона. Однако, по нашим наблюдениям, в еще большей мере активность кальпаинов и протеасом зависит от возраста, будучи максимальной у рыб первого года жизни и прогрессивно снижаясь в последующие годы. Так, сходные возрастные зависимости интенсивности белкового распада в скелетных мышцах были показаны для атлантического лосося [12, 18], кумжи [30] и радужной форели [31].

Механизмы температурной чувствительности ферментов протеолиза в данном случае неясны, поскольку изучаемый температурный спектр соответствует максимальной активности этих ферментов *in vitro*, а их температурная инактивация наблюдается лишь при 58–60°C [11, 12]. Однако, *in vivo* их активность регулируется множеством механизмов, включая скоординированную взаиморегуляцию с процессами белкового синтеза в ситуациях с преобладанием анаболических или катаболических процессов [32]. Протеолитическая активность протеасом служит ключевым звеном системы контроля качества клеточных белков, отвечающим за элиминацию меченых убиквитином дефектных полипептидов. Однако, в скелетных мышцах рыб эта активность не так высока, как в других органах [33], а компактная упаковка миофибриллярных белков делает их недоступными для гидролиза протеасомами и требует

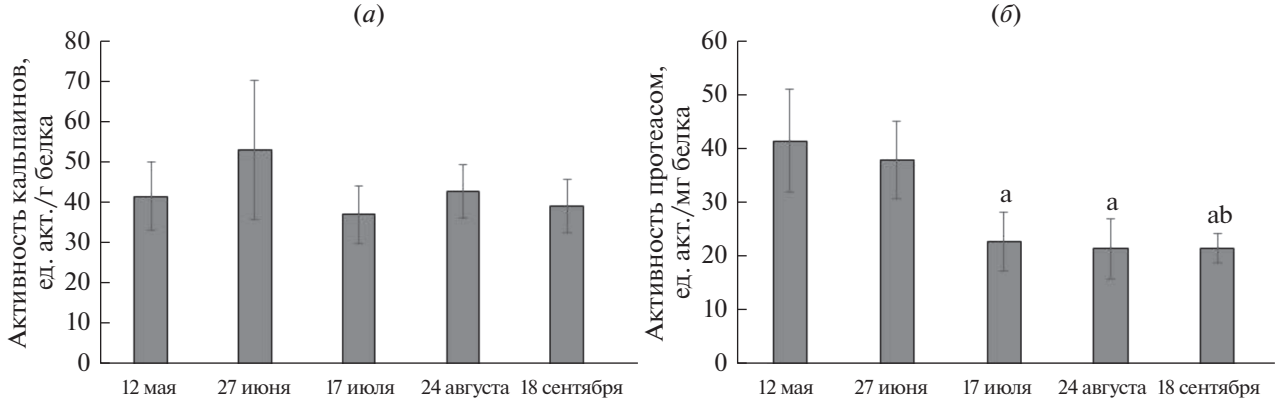


Рис. 2. Уровень активности кальпаинов и химотрипсинподобной активности протеасом в скелетных мышцах радужной форели. a – различия достоверны по сравнению с 12 мая, b – по сравнению с 27 июня.

участия других протеиназ, преимущественно кальпаинов, для их дезинтеграции [10]. Кальцийзависимые протеиназы скелетных мышц рыб имеют более широкую субстратную специфичность по сравнению с кальпаинами млекопитающих и гидролизуют основные структурные белки, включая миозин, тропомиозин, α-актинин, тропонины T и I, десмин [32]. Помимо рутинной деградации белка, кальпаины непосредственно участвуют в миогенезе, в частности, высокоселективным образом гидролизуя белки цитоскелета в ходе слияния миобластов скелетных мышц [34]. Показано, что уровень экспрессии генов кальпаинов 1 и 2 также повышается при дифференцировке мышечных клеток [35], а на более поздних стадиях миогенной дифференцировки к ним подключается кальпаин 3, специфичный для скелетных мышц [36]. Участие кальпаинов в этих высокорегулируемых процессах становится возможным при физиологическом снижении экспрессии их эндогенного ингибитора, кальпастатина, на ранних стадиях дифференцировки мышечных клеток до полной его элиминации при их слиянии [37].

Таким образом, описанные нами изменения процессов мышечного роста у рыб в благоприятные для роста периоды и при гипертермии происходят сопряженным образом и затрагивают не только белковый синтез и миогенез, но и белковую деградацию. Интенсивный рост рыб сопровождается высокой транскрипционной активностью гена миозина при сдерживающем влиянии миостатина, высокой скоростью обмена белков и стабильным уровнем миогенных регуляторных факторов *MyoG* и *MyoD1b*. Физиологические ростовые процессы, связанные с синтезом, аккумуляцией и обменом скелетномышечных белков, тормозятся в период гипертермии за счет изменений активности обслуживающих эти процессы ферментных систем и уровня регуляторов миогенеза. Одним из механизмов торможения роста форели при гипертермии служит, по-видимому, температурозависимое снижение экспрессии миозина, приводящий к активации компенсаторных механизмов – повышению экспрессии положительных регуляторов миогенеза *MyoG* и *MyoD1b*, снижению репрессирующего влияния миостатина и торможению реакций белковой деградации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Схема эксперимента и отбор проб. Объектом исследования служили самки радужной форели возраста 2+, выращиваемые в садках (оз. Ладмозеро, Медвежьегорский р-н, Республика Карелия) на стандартном коммерческом корме для форели BioMar (Дания). Проводился ежедневный мониторинг температуры воды и содержания растворенного кислорода, как известно, связанных отрицательной зависимостью. В год наблюдений значения последнего составляли от 13.6 до 7.2 мг/л с минимумом в период высоких температур и не выходили за пределы оптимальных для форели значений (7.0 мг/л). Отбор проб осуществлялся ежемесячно, с мая по сентябрь 2018 г.; размер выборки – 8 особей. Помимо измерения длины и массы рыб, фиксировались образцы их белых скелетных мышц (–80°C) для последующего биохимического и молекулярно-генетического анализа.

Реагенты и оборудование. В работе были использованы химические реагенты, ингибиторы и субстраты протеиназ, произведенные Sigma-Aldrich (США) и ЗАО Евроген (Россия); приборы: низкотемпературная морозильная камера UF 240-86 E (Snijders Scientific, Нидерланды), гомогенизатор TissueLyser LT (Qiagen, Германия), центрифуга Allegra 64R (Beckman Coulter, США), мультимодальный планшетный ридер CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия), спектрофотометр Implen NanoPhotometer C (Implen, Германия), амплификатор Real-Time CFX96 Touch (BioRad, США).

Таблица 2. Последовательности праймеров для ПЦР в реальном времени

Ген	Последовательность 5'-3'	Размер фрагмента, п.о.	Номер в GenBank
EF-1a	F: GGTGGTGTGGGTGAGTTTGAG R: AACCGCTTCTGGCTGTAGGG	149	NM_001124339.1
MyHC	F: AGAATGTTCGCCAGGTCAATG R: TCCTCAATCGCCCTCTTCAG	169	Z48794
MyoG	F: TGAACGAGGCATTCGAGGC R: AGTGCCTGCAGCCTCTCAA	115	NM_001124727.1
MyoD1b	F: ATTTCGTTCCCTGTCACCTCTG R: TCGTCTTCGTTGTAATGG	146	NM_001124728.1
MSTN-1a	F: CGGAAACCCAAGTGTTGCTTATTC R: GGCATCAGGCGGGAGATTTG	137	NM_001124282.1

Выделение тотальной РНК и проведение обратной транскрипции. Тотальную РНК выделяли из белых мышц с помощью набора RNA-extran по протоколу производителя. Затем общую РНК обрабатывали с помощью ДНКазы. Целостность и качество РНК оценивали методом электрофореза на 1% агарозном геле и спектрофотометрически с коэффициентом поглощения 260/280 нм. РНК использовали для обратной транскрипции с применением MMLV-обратной транскриптазы и случайных гексамерных праймеров.

ПЦР в реальном времени. Праймеры для *MyHC*, *MyoG*, *MyoD1b*, *MSTN-1a* и *Ef-1*α были подобраны с помощью программы Beacon Designer 5.0 (Premier Biosoft, США). Последовательности праймеров представлены в табл. 2. Амплификацию 2 мкл кДНК проводили с использованием 5 мкл qPCRmix-HS SYBR Green 5× (Евроген, Россия) и 500 нМ праймеров в конечном объеме смеси 25 мкл. Условия ПЦР были следующими: денатурация ДНК – 5 мин при 95°C; повторяющиеся циклы (30–35): денатурация 20 с при 95°C, отжиг праймеров 30 с при 60°C, и элонгация 30 с при 72°C. Анализировали кривую плавления для подтверждения, что пары праймеров для каждого анализа qPCR генерируют один единственный продукт. Для расчета эффективности ПЦР использовались стандартные кривые, с использованием 5-кратного разбавления смеси кДНК из всех образцов. Каждый образец повторялся трижды на плашке. Относительные уровни экспрессии генов определяли методом анализа порогового цикла (КТ) и нормализовали по отношению к Ef-1α используя метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [38].

Получение препаратов протеиназ. Ткани были подвергнуты гомогенизации в 20 мМ Трис-HCl-буфере (pH 7.5) с добавлением 150 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА-Na, 20 мМ ДТТ, 0.1%-го Triton X-100, 1 мМ АТР, 5 мМ $MgCl_2$, смеси ингибиторов протеиназ (1 мМ PMSF, 1 мкг/мл лейпептина, 1 мкг/мл пепстатина) в соотношении 1 : 10 (вес/объем) и центрифугированию (20000 *g*, 20 мин).

Анализ протеолитической активности кальпаинов. В полученном супернатанте (ферментная фракция) была протестирована активность кальпаинов – кальцийзависимая казеинолитическая активность, чувствительная к ингибиторам цистеиновых протеиназ [39]. Реакционная смесь, общим объемом 500 мкл, включала 1 мг/мл денатурированного щелочью казеина, 20 мМ ДТТ, 200 мкл ферментной фракции и 5 мМ $CaCl_2$ (кальцийзависимая активность) или хелатора Ca^{2+} ЭДТА-Na (Ca^{2+}-независимая активность) в 50 мМ Трис-HCl-буфере (pH 7.5). После 30-мин инкубации (28°C) в реакционной смеси было определено содержание остаточного белка по методу Брэдфорд [40]. За единицу активности (ед. акт.) кальпаинов было принято количество фермента, вызывающее увеличение оптического поглощения при 595 нм на 0.1 ОЕ за 1 ч инкубации при 28°C. Удельная активность кальпаинов была определена в расчете на 1 г белка.

Анализ протеолитической активности протеасом. Химотрипсинподобную активность (ХПА) протеасом определяли по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC. Реакционная смесь содержала 20 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 1 мМ ДТТ, 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ АТР и 30 мкМ субстрата. Флуоресценцию образцов измеряли при длине волны возбуждения 380 нм и длине волны испускания 440 нм. Для оценки активности примесных протеиназ использовали ингибитор ХПА протеасом MG132. При расчете ХПА протеасом из общей активности вычитали остаточную активность в присутствии 5 мкМ MG132. Активность (ед. акт.) выражали в условных единицах показаний флуориметра и нормализовали по содержанию в пробах белка.

Анализ содержания белка. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорд [40] с использованием BSA в качестве стандарта.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ результатов проводили при помощи критерия Краскела–Уоллиса с последующим сравнением выборок с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Взаимосвязь исследуемых показателей между собой оценивали при помощи линейной регрессии и корреляционного анализа по Пирсону.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность О.Н. Кремневу за организацию работы на форелевом хозяйстве. Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук".

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-74-20098). Участие М.Ю. Крупновой поддержано из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания № 0218-2019-0076.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работы проведены на самках радужной форели возраста 2+ с соблюдением международных принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/EC), и правил проведения работ с экспериментальными животными.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Houlihan D.F., Mathers E.M., Foster A.* // Fish Ecophysiology / Eds. Rankin J.C., Jensen F.B. London, UK., 1993. Ch. 2. P. 45–71.
2. *Bureau D.P., Hua K., Cho C.Y.* // Aqua. Res. 2006. V. 37. P. 1090–1098. https://doi.org/10.1007/s10499-015-9911-x
3. *Overturf K., Hardy R.* // Aquat. Res. 2001. V. 32. P. 315–322. https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00582.x
4. *Hevroy E.M., Jordal A.-E.O., Hordvik Espe M., Hemre G.-I., Olsvik P.A* // Aquaculture. 2006. V. 252. P. 453–461. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.003
5. *Imsland A.K., Le Francois N.R., Lammare S.G., Ditlecadet D., Sigurosson S., Foss A.* // Can J. Fish Aquat. Sci. 2006. V. 63. P. 1959–1967. https://doi.org/10.1139/F06-091
6. *Dhillon R.S., Wang Y., Tufts B.L.* // Comp. Biochem. Physiol. C. 2008. V. 48. P. 452.
7. *Johnston I.A.* // J. Exp. Biol. 2006. V. 209. P. 2249–2264. https://doi.org/10.1242/jeb.02153
8. *Watabe S.* // Muscle Development and Growth / Ed. Johnston I.A. London: Acad. Press, 2001. P. 19–41.
9. *Ciechanover A.* // Bioorg. Med. Chem. 2013. V. 21. P. 3400–3410. https://doi.org/10.1002/anie.200501428
10. *Goll D.E., Neti G., Mares S.W., Thompson V.F.* // J. Anim. Sci. 2008. V. 86. P. E19–E35. https://doi.org/10.2527/jas.2007-0395
11. *Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Ушакова Н.В., Немова Н.Н.* // Биоорган. химия. 2012. Т. 38. С. 324–332. [*Lysenko L.A., Kantserova N.P., Ushakova N.V., Nemova N.N.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2012. V. 38. P. 282–289.] https://doi.org/10.1134/S1068162012020070
12. *Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Крупнова М.Ю., Веселов А.Е., Немова Н.Н.* // Биоорган. химия. 2015. Т. 41. С. 717–724. [*Lysenko L.A., Kantserova N.P., Krupnova M.Yu., Veselov A.E., Nemova N.N.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. V. 41. P. 645–651.] https://doi.org/10.1134/S1068162015060096
13. *Overturf K., Gaylord T.G.* // Comp. Biochem. Physiol. B. 2009. V. 152. P. 150–160. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.10.012
14. *Salem M., Silverstein J., Rexroad C.E., Yao J.* // BMC Genomics. 2007. V. 8. P. 328. https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-328
15. *Cleveland B.M., Burr G.S.* // Aquaculture. 2011. V. 319. P. 194–204. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.043
16. *Salmerón C., García de la serrana D., Jiménez-Amilburu V., Fontanillas R., Navarro I., Johnston I.A., Gutiérrez J., Capilla E.* // PLoS One. 2013. V. 8. P. 75349. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075349
17. *Kantserova N.P., Lysenko L.A., Veselov A.E., Nemova N.N.* // Fish Physiol. Biochem. 2017. V. 434. P. 1187–1194. https://doi.org/10.1007/s10695-017-0364-1
18. *Lysenko L.A., Kantserova N.P., Kaivarainen E.I., Krupnova M.Yu., Nemova N.N.* // Comp. Biochem. Physiol. B. 2017. V. 211. P. 22–28. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.05.001
19. *Зданович В.В., Пушкарь В.Я., Келехсаев М.З.* // Вопр. ихтиол. 2011. Т. 51. С. 494–501.
20. *Funkenstein B, Skopal T., Rapoport B.Y., Rebhan Y., Radaelli G.* // Comp. Biochem. Physiol. D. 2007. V. 2. P. 187–199. https://doi.org/10.1016/j.cbd.2007.04.001
21. *Blackwell T., Weintraub H.* // Science. 1990. V. 250. P. 1104–1110. https://doi.org/10.1126/science.2174572
22. *Johansen K.A., Overturf K.* // Mar. Biotechnol. 2005. V. 7. P. 576–587. https://doi.org/10.1007/s10126-004-5133-3
23. *Macqueen D.J., Robb D., Johnston I.A.* // J. Exp. Biol. 2007. V. 210. P. 2781–2794. https://doi.org/10.1242/jeb.006981

24. *Johansen K.A., Overturf K.* // Comp. Biochem. Physiol. B. 2006. V. 144. P. 119–127. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.02.001
25. *Bower N.I., Taylor R.G., Johnston I.A.* // Front. Zool. 2009. V. 6. P. 18. https://doi.org/10.1186/1742-9994-6-8
26. *Macqueen D.J., Johnston I.A.* // FEBS Lett. 2006. V. 580. P. 4996–5002. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.016
27. *Churova M.V., Meshcheryakova O.V., Veselov A.E., Efremov D.A., Nemova N.N.* // Fish Physiol. Biochem. 2017. V. 43. P. 1117–1130. https://doi.org/10.1007/s10695-017-0357-0
28. *Almeida F.L.A., Pessoti N.S, Pinhal D., Padovani C.R., Leitão N.J., Carvalho R.F., Martins C., Portella M.C., Dal Pai-Silva M.* // Micron. 2010. V. 41. P. 997–1004. https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.06.012
29. *Berkes C.A., Tapscott S.J.* // Semin. Cell. Dev. Biol. 2005. V. 16. P. 585–595. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.07.006
30. *Kantserova N.P., Lysenko L.A., Krupnova M.Yu., Nemova N.N.* // KnE Life Science. 2020. P. 283–294. https://doi.org/10.18502/kls.v5i1.6070
31. *Lysenko L.A., Kantserova N.P., Churova M.V., Tushina E.D., Nemova N.N.* // KnE Life Science. 2020. P. 581–591. https://doi.org/10.18502/kls.v5i1.6131
32. *Nemova N.N., Lysenko L.A., Kantserova N.P.* // Rus. J. Dev. Biol. 2016. V. 47. P. 161–172. https://doi.org/10.1134/S1062360416040068
33. *Seiliez I., Dias K., Cleveland B.M.* // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2014. V. 307. P. R1330–R1337. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00370.2014
34. *Schollmeyer J.E.* // Exp. Cell Res. 1986. V. 162. P. 411–422. https://doi.org/10.1016/0014-4827(86)90346-0
35. *Poussard S., Cottin P., Brustis G.G., Talmat S., Elamrani N., Ducastaing A.* // Biochimie. 1993. V. 75. P. 885–890.
36. *Kramerova I., Kudryashova E., Wu B., Spencer M.J.* // Mol. Cell Biol. 2006. V. 26. P. 8437–8447. https://doi.org/10.1128/MCB.01296-06
37. *Barnoy S., Maki M., Kosower N.S.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 332. P. 697–701. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.010
38. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262
39. *Enns D.L., Belcastro A.N.* // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2006. V. 84. P. 601–609. https://doi.org/10.1139/y06-013
40. *Bradford M.M.* // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.

Effect of Hyperthermia on Proteases and Growth Regulators in the Skeletal Muscle of Cultivated Rainbow Trout *O. mykiss*

N. P. Kantserova*,#, M. V. Churova*, L. A. Lysenko*, E. D. Tushina*, M. A. Rodin*, M. Yu. Krupnova *, and I. V. Sukhovskaya*

#Phone: +7 (8142) 76-98-10; e-mail: nkantserova@yandex.ru

**Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, ul. Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

The expression of some structural and regulatory muscle protein genes as well as the activity of the main intracellular proteases (calpains, proteasomes) in caged rainbow trout in the periods favorable for growth and under hyperthermia were estimated. Intense growth of fish was accompanied by high transcriptional activity of myosin heavy chain (*MyHC*) gene with the constraining influence of myostatin, high protein turnover rate, and stable levels of myogenic factors, *MyoG* and *MyoD1b*. Trout growth retardation in response to summer increase in water temperature was associated with a decrease in gene expression of the main protein of myofibrils, myosin. In hyperthermia, proteolytic activity of calpains and proteasomes, which determine the level of protein degradation in muscle and thereby regulate the intensity of protein accumulation and overall growth, also decreased. Thus, changes in the intensity of myofibrillar protein synthesis, myogenesis, and protein degradation in rainbow trout during periods favorable for growth and under hyperthermia occur in a coordinated manner indicating relationship of these processes.

Keywords: myosin, myogenic regulation factors, calpains, proteasome, growth, rainbow trout, hyperthermia

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 736–745

УДК 57.017.35

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ SiFe С ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ И ЛИМФОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ

© 2020 г. Н. В. Шаронова*, **, Е. В. Свирщевская*, А. А. Попов*, Н. В. Карпов*, Г. В. Тихоновский*, А. Ю. Захаркив*, С. В. Сизова***, В. Ю. Тимошенко*, С. М. Климентов*, В. А. Олейников*, ***, #**

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

***МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова), Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86*

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

Поступила в редакцию 25.04.2020 г.
После доработки 02.05.2020 г.
Принята к публикации 10.05.2020 г.

Кремний и наночастицы на его основе (SiNP) привлекают внимание исследователей в связи с биосовместимостью и ассимиляцией кремния тканями организма. Введение железа в состав SiNP (SiFeNP) позволяет использовать ферромагнитные свойства железа для детекции NP и возможности терапевтического использования SiFeNP. Целью данной работы являлся анализ взаимодействия SiFeNP с эпителиальными клетками (ЭК) COLO357 и SW620 и лимфоцитами периферической крови (ЛПК) человека. SiFeNP были получены методом лазерной абляции и разделены на NP1 и NP2 размером 100 и 150 нм соответственно. Анализ цитотоксичности, индукции апоптоза, продукции активных форм кислорода (АФК) и влияния на метаболизм лизосом SiFeNP проводили методами *in vitro*. Показали, что ЭК эффективно эндоцитировали оба типа NP, что приводило к увеличению гранулярности клеток. NP не вызывали апоптоза или некроза ЭК, накапливались в лизосомах, что приводило к снижению мембранного потенциала лизосом. В свою очередь, снижение уровня метаболизма ЭК приводило к постепенному (на 24 ч) повышению продукции АФК на 10–15%. При этом NP1 вызывали больше АФК, чем NP2, и больше накапливались в ЭК, что может быть результатом различия в размере частиц. SiFeNP не взаимодействовали с ЛПК. Таким образом, общая цитотоксичность SiFeNP не превышала 20%, что связано со снижением метаболизма лизосом и незначительной продукцией АФК.

Ключевые слова: железосодержащие наночастицы кремния, цитотоксичность, апоптоз, мембранный потенциал лизосом, продукция АФК

DOI: 10.31857/S0132342320060287

ВВЕДЕНИЕ

Кремний входит в состав различных тканей организма, где накапливается в местах активного роста костей, в коже, различных мягких тканях. С возрастом количество кремния в организме снижается, что ведет к остеопорозу и артрозам. Снижение кремния также наблюдается при опухолевом процессе. В настоящее время разработан ряд способов получения наночастиц кремния (SiNP), пригодных для биологических приложений [1–3]. Распространенность и относительно невысокая стоимость материала, биодеградируемость и биосовместимость, возможность получения NP различной структуры делает кремний перспективным материалом для использования в разных областях науки, техники и медицины. В медицине кремний и частицы на его основе используются для доставки лекарств в опухоли [4–7] или для регенерации костной ткани [8, 9]. Есть исследования наночастиц кремния с малым содержанием оксида железа, полученных плазменным абляционным синтезом, показывающие возможность применения наночастиц кремния в МРТ-диагностике [10].

Показано, что введение некоторого количества железа позволяет визуализировать NP в клетках. Так, SiFeNP размером 1.5 нм методом ТЕМ обнаружили в мембране митохондрий [11]. Добавка же-

Сокращения: SiNP – нанокремний; SiFeNP – железосодержащий нанокремний; NP – наночастицы.

Автор для связи: (тел.: +7 (910) 409-84-55; факс: +7 (495) 330-40-11; эл. почта: voleinik@mail.ru).

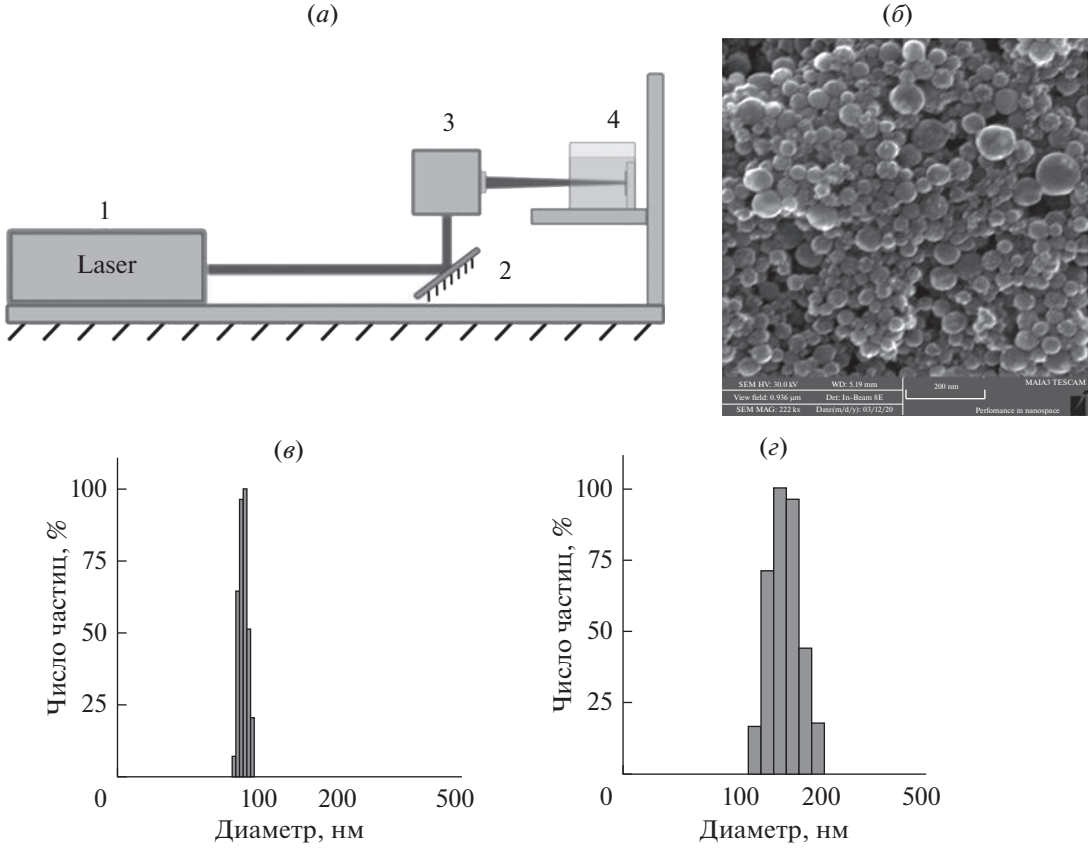


Рис. 1. Получение и характеристика наночастиц SiFeNP. (*а*) Схематичное представление процесса лазерной абляции в жидкости. 1 – Yb:KGW лазер, 2 – зеркало, 3 – гальванометрический сканатор, 4 – кювета, наполненная жидкостью, и мишень. (*б*) TEM изображение наночастиц SiFeNP. (*в–г*) Размер и полидисперсность NP1 (*в*) и NP2 (*г*).

леза в SiNP также усиливает продукцию АФК [11] по механизму реакции Фентона.

Одним из спорных вопросов является цитотоксичность NP различного состава, в том числе кремния [12]. Анализ литературных данных показал, что в диапазоне менее 1 мкг/мл SiNP не влияют на функциональную активность клеток; в диапазоне до 20 мкг/мл SiNP стимулируют пролиферацию клеток; при повышении концентрации *in vitro* до 80–120 мкг/мл наблюдается выраженная токсичность [13, 14]. Показано, что при высоких концентрациях механизм клеточной гибели под действием NP связан с изменением функции митохондрий, лизосом, эндоплазматического ретикулума, окислительным стрессом, что заканчивается апоптозом клеток [12]. Одним из механизмов токсичности может быть наличие силанольных групп, возникающих на поверхности SiNP и отвечающих за формирование АФК [15].

Анализ токсичности SiFeNP *in vivo* показал, что такие частицы в клинически значимых количествах (10–20 мг/кг) полностью ассимилируются без признаков токсичности [16]. Отсутствие значительной токсичности SiFeNP показано и *in vitro* [17]. Также токсичность может зависеть от состава NP и их размера [18, 19].

Целью данной работы являлся анализ механизмов цитотоксичности SiFeNP двух размеров для эпителиальных и лимфоидных клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие SiFeNP с эпителиальными клетками

Схема получения наночастиц лазерной абляцией приведена на рис. 1*а*. Общий вид исходных SiFeNP, содержащих Si : Fe в соотношении 60 : 40, приведен на рис. 1*б*. Разделение исходных NP на частицы NP1 диаметром 96 ± 10 нм и NP2 диаметром 150 ± 25 нм (рис. 1*в*–1*г*) провели методом центрифугирования. Взаимодействие с клетками анализировали для NP1 и NP2 отдельно.

Для определения общего характера взаимодействия SiFeNP с эпителиальными клетками использовали две линии клеток – рака поджелудочной железы COLO357 и рака толстой кишки SW620. Инкубация 24 ч клеток с SiFeNP приводила к эндоцитозу NP, что выражалось в повышении гранулярно-

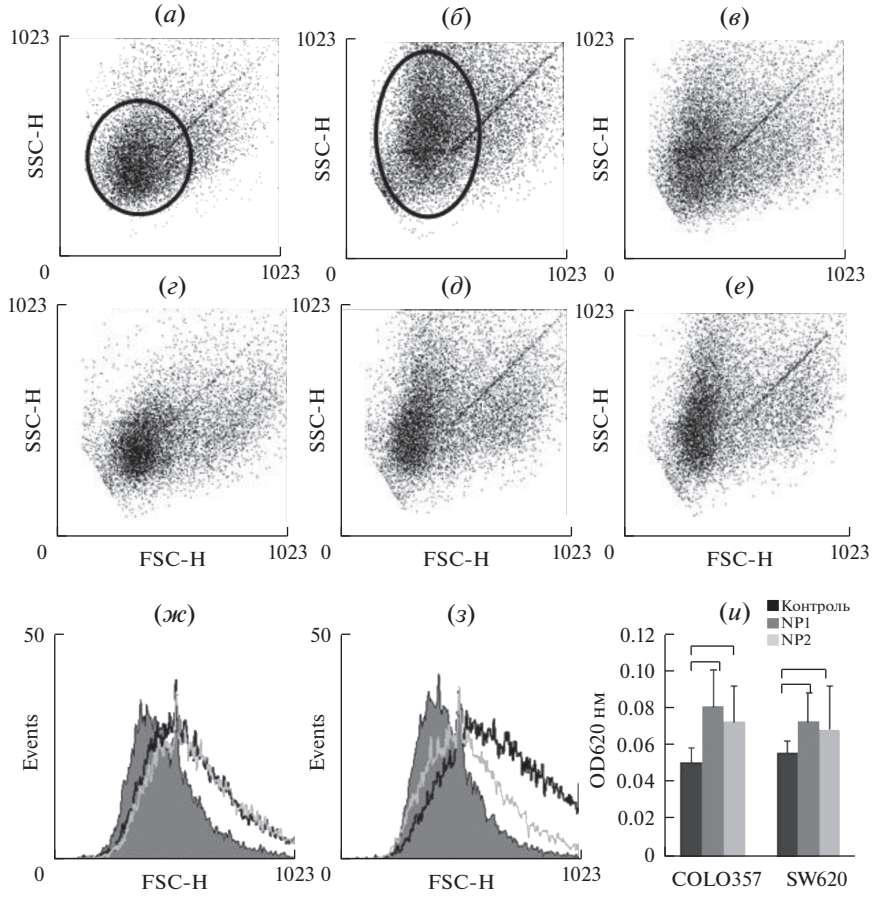


Рис. 2. Взаимодействие SiFeNP с эпителиальными клетками. (*а*–*е*) Распределение клеток SW620 (*а*–*в*) и COLO357 (*г*–*е*) по гранулярности (SSC) и размеру (FSC) до (*а*, *г*) и после инкубации 24 ч с NP1 (*б*, *д*) и NP2 (*в*, *е*). Кругом и овалом отмечены основные популяции клеток до и после инкубации с наночастицами. (*ж*–*з*) Гистограммы распределения по гранулярности клеток SW620 (*ж*) и COLO357 (*з*) до (серая гистограмма) и после инкубации 24 ч с NP1 (черная линия) и NP2 (серая линия). (*и*) Оптическая плотность (620 нм) клеток COLO357 и SW620 до (контроль) и после 24 ч инкубации с наночастицами NP1 и NP2.

сти, но не размера клеток (рис. 2*а*–2*е*). На линии SW620 уровень повышения гранулярности был достоверно выше для NP1, чем для NP2 (рис. 2*ж*), различий на линии COLO357 не было (рис. 2*з*).

Для количественной оценки эндоцитоза эпителиальные клетки после инкубации 24 ч с наночастицами снимали с подложки трипсином, отмывали физраствором, что позволяло удалить основное количество частиц с мембраны клеток. Отмытые клетки разносили по 96-луночному планшету и оценивали внутриклеточную локализацию наночастиц по поглощению видимого света (620 нм) (рис. 2*и*). Поглощение NP1 было несколько больше, чем NP2, но различие было недостоверным. В то же время, поглощение в культурах с NP1 и NP2 достоверно было выше, чем в контроле, что свидетельствует о внутриклеточной локализации наночастиц.

Цитотоксичность SiFeNP оценивали двумя методами: по оценке количества митохондрий в клетках после инкубации 72 ч с наночастицами (MTT-тест) и по анализу клеток, включающих йодистый пропидий (PI) методом проточной цитометрии. Анализ методом MTT предполагает, что вносимые реагенты не интерферируют с процессом восстановления красителя и не снижают количества и активности митохондрий в клетках, что может быть не так для наночастиц. Поэтому дополнительно использовали метод анализа по включению красителя PI, который проходит через мембрану поврежденных (апоптотических и некротических) клеток и встраивается в ДНК. Показали методом MTT, что в широком диапазоне концентраций общая токсичность NP не превышала 20% (рис. 3*а*–3*б*). При этом на клетках линии COLO357 в диапазоне меньше 5 мкг/мл наночастицы стимулировали пролиферацию (рис. 3*а*), что раньше было показано и другими исследователями для SiNP [12]. Интересно, что пик токсичности наночастиц для клеток SW620 наблюдался не на максимальной концентрации, а в диапазоне около 5 мкг/мл (рис. 3*б*). Метод MTT требует ин-

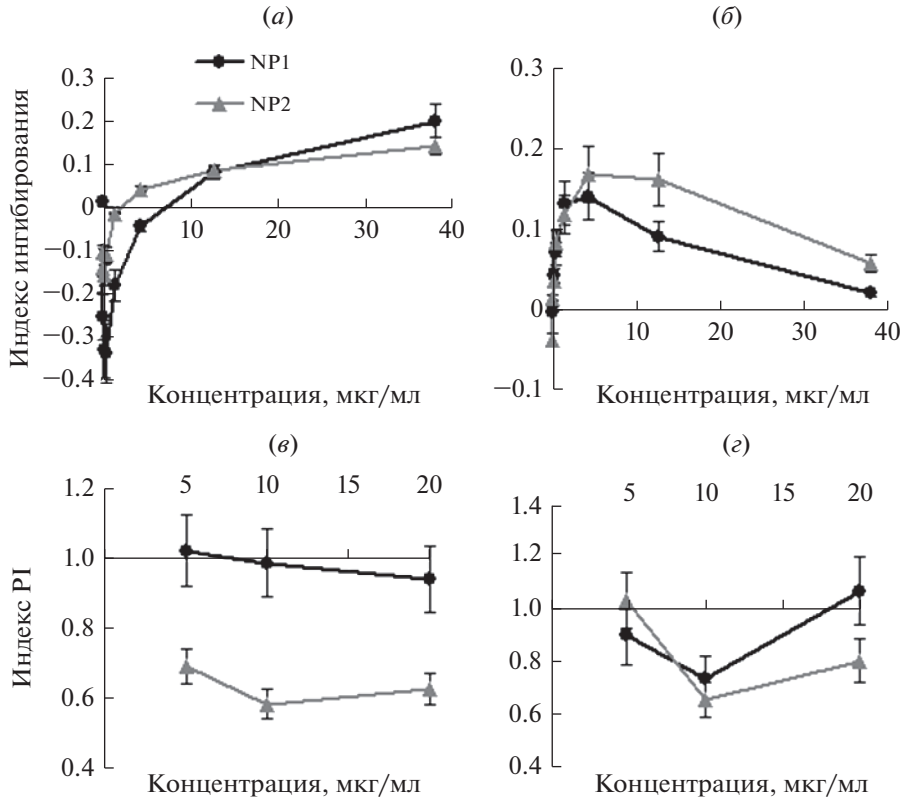


Рис. 3. Характеристика взаимодействия наночастиц SiFe с эпителиальными клетками. (*а*–*г*) Анализ дозозависимой цитотоксичности методом MTT после инкубации 72 ч (*а*, *б*) и методом проточной цитометрии с использованием йодистого пропидия (PI) (*в*, *г*) NP1 и NP2 на клетках COLO357 (*а*, *в*) и SW620 (*б*, *г*) после инкубации 24 ч.

кубации 72 ч для достижения значимых различий в количестве клеток, поскольку цикл деления эпителиальных клеток составляет около 24 ч.

Раннюю токсичность можно определить уже через 24 ч методом проточной цитометрии. Анализ показал, что NP1 и особенно NP2 не только не вызывали гибели клеток, но и снижали долю спонтанного апоптоза и некроза в культурах ЭК (рис. 3*в*–3*г*). Соответственно, механизмы выявленной цитотоксичности не связаны с индукцией апоптоза в ЭК.

Одним из механизмов спонтанной гибели клеток в культурах является конститутивная продукция определенного уровня АФК. Для анализа продукции АФК под действием SiFeNP также использовали два метода: спектрофлуорометрию и проточную цитометрию при добавлении красителя DCF, переходящего под действием АФК из бесцветной во флуоресцентную форму. Показали, что инкубация ЭК с NP1 4–8 ч приводила к дозозависимому повышению синтеза АФК максимально на 5% от спонтанного уровня; через 20 ч АФК накапливались, но суммарный уровень не превышал 15% спонтанной продукции АФК (рис. 4*а*–4*б*). Инкубация ЭК с NP2 4–8 ч снижала спонтанную продукцию АФК, особенно это очевидно на клетках COLO357 (рис. 4*в*). Усиление продукции ЭК на 20 ч не превышало 5% от спонтанного уровня (рис. 4*в*–4*г*). Анализ внутриклеточной продукции АФК методом проточной цитометрии подтвердил отсутствие значительного эффекта SiFeNP на продукцию АФК (рис. 4*д*–4*е*).

Визуально осадок ЭК после обработки трипсином и центрифугирования имел серый цвет в культурах с SiFeNP в отличие от белого осадка в контроле, что также регистрировалось по увеличению оптической плотности клеток (рис. 2*и*). Известно, что дзета-потенциал наночастиц железа, растворенных в воде, составляет +16–22 мВ [20], а наночастиц кремния в воде –35 мВ [21]. Дзета-потенциал SiFeNP составил -16 ± 3 мВ. Ранее нами было показано, что отрицательно заряженные частицы эффективно транспортируются в лизосомы [22]. Соответственно, SiFeNP после эндоцитоза ЭК транспортируются, скорее всего, в лизосомы. Заполнение лизосом наночастицами должно приводить к изменению мембранного потенциала. Изменение мембранного потенциала лизосом анализировали с помощью pH чувствительного красителя LTR. Повышение внутрилизосомального pH приводит к снижению мембранного потенциала и пропорциональному снижению све-

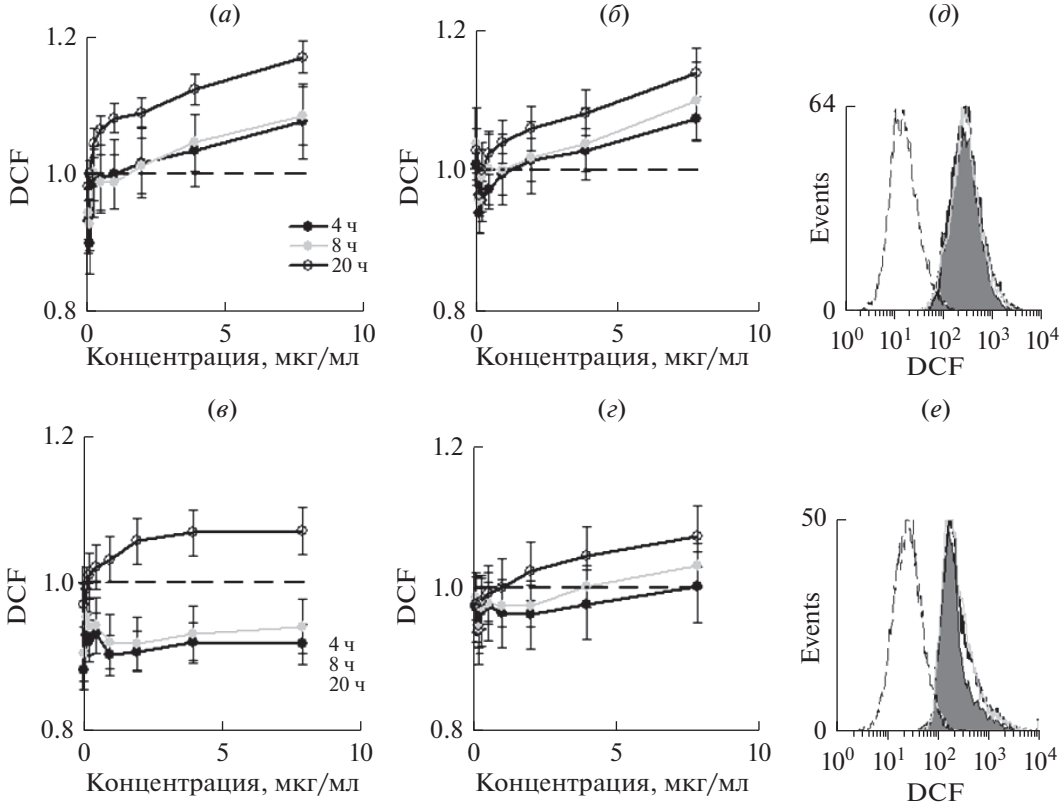


Рис. 4. Эффект наночастиц SiFe на продукцию активных форм кислорода (АФК). (*а*–*г*) Клетки COLO357 (*а*, *в*) и SW620 (*б*, *г*) инкубировали с наночастицами NP1 (*а*, *б*) или NP2 (*в*, *г*) 4, 8 или 24 ч в присутствии реактива DCF и анализировали внеклеточную продукцию АФК на планшетном ридере. (*д*–*е*) Анализ внутриклеточной продукции АФК методом цитометрии в клетках COLO357 (*д*) и SW620 (*е*); штриховой линией обозначен контроль до внесения DCF; серой гистограммой обозначен контроль; черной и серой линиями обозначены клетки после инкубации 4 ч с 20 мкг/мл NP1 и NP2 соответственно.

чения LTR. Показали, что как NP1, так и NP2 вызывали дозозависимое снижение мембранного потенциала лизосом ЭК (рис. 5). Частицы NP1 в концентрации меньше 2 мкг/мл вызывали выраженный стимулирующий эффект (рис. 5*а*, 5*б*); для NP2 эффект стимуляции был мало выражен (рис. 5*в*, 5*г*). Максимальный эффект наблюдался уже через 4 ч и достоверно снижался через 8 и 24 ч (рис. 5). Таким образом, SiFeNP транспортируются в лизосомы. Накопление наночастиц в лизосомах изменяет общий метаболизм клеток, что, в свою очередь, замедляет пролиферацию ЭК, в результате чего регистрируется снижение пролиферации клеток при определении методом МТТ (рис. 3).

Взаимодействие SiFeNP с лимфоцитами

Лимфоциты периферической крови (ЛПК) не могут захватывать наночастицы по механизму эндоцитоза. В том случае, если есть рецепторное взаимодействие, наночастицы будут попадать в ЛПК. Анализ гранулярности и размера ЛПК после 48 ч инкубации с наночастицами показал отсутствие захвата NP1 (рис. 6*а*, 6*б*). Аналогичные данные получены и для NP2. Анализ оптической плотности клеток в видимом диапазоне также не показал захвата наночастиц ЛПК (рис. 6*в*). Дополнительно оценивали токсичность наночастиц для ЛПК методом анализа по связыванию аннексина V, для которого характерно связывание с клетками, находящимися на ранней стадии апоптоза. Показали отсутствие индукции апоптоза в ЛПК наночастицами (рис. 6*г*–6*е*). Клетки в стадии раннего апоптоза локализуются в правом нижнем квадранте, позднего апоптоза – в правом верхнем квандранте, некротические – в левом верхнем квадранте. Численные данные указаны по углам квадрантов. Соответственно, SiFeNP не взаимодействуют с ЛПК.

Анализ литературы показал, что SiNP размером 2–16 нм способны взаимодействовать с ЛПК, что выражалось в повышении на Т-клетках экспрессии активационных маркеров CD26 и CD69, продукции интерферона гамма, но не продукции интерлейкинов (ИЛ) 2, 4 и 10 [23]. В этой же работе показано, что FeNP такого же размера не вызывали активации Т-клеток. С другой стороны, в ра-

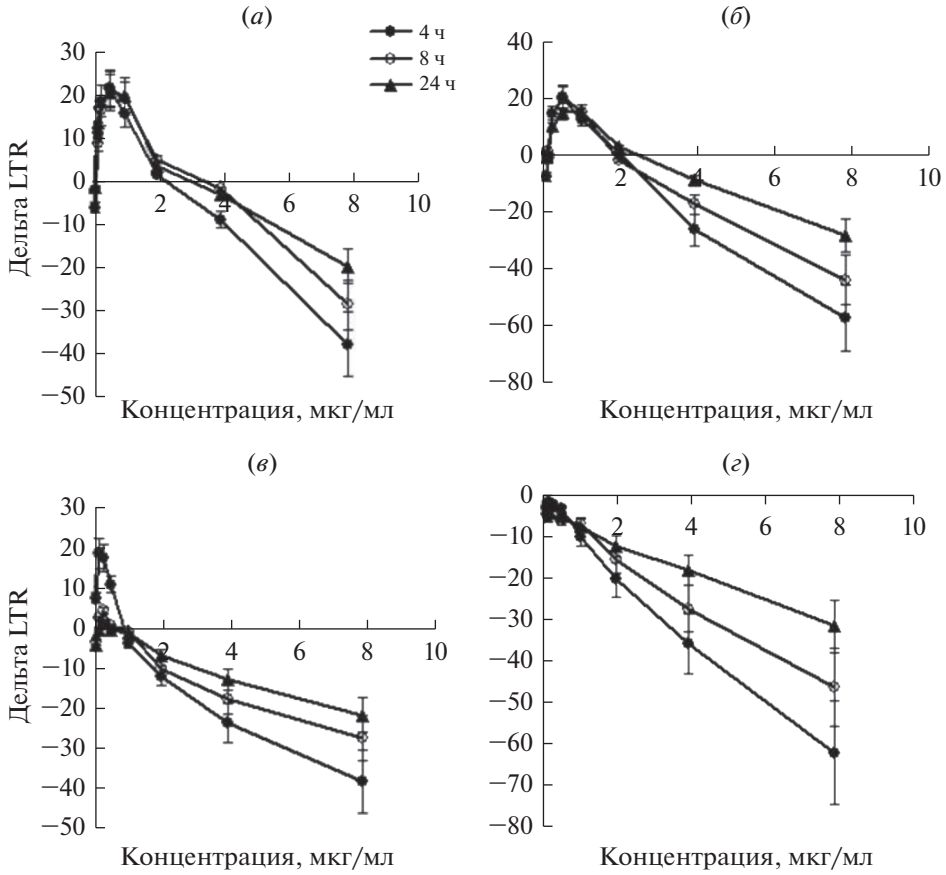


Рис. 5. Эффект наночастиц SiFeNP на мембранный потенциал лизосом эпителиальных клеток. Клетки COLO357 (*а*, *в*) и SW620 (*б*, *г*) инкубировали с наночастицами NP1 (*а*, *б*) или NP2 (*в*, *г*) 4, 8 или 24 ч. Потенциал-чувствительный трекер лизосом LTR добавляли на последние 30 мин инкубации.

боте Al Soubaihi с соавторами не выявили прямого действия кремниевых пластинок на ЛПК [24]. В работе Jiménez-Villarreal с соавторами провели анализ влияния SiNP и FeNP на фрагментацию ДНК в ЛПК после перорального введения частиц. Авторы показали увеличения доли ЛПК с фрагментированной ДНК [25]. Последние данные вызывают вопросы, поскольку после перорального введения наночастицы быстро попадают в желудок, откуда выводятся в ЖКТ и из организма. Нет данных, показывающих способность таких наночастиц попадать в кровь. В работе Zasonska с соавторами анализировали эффект SiFeNP размером 13 нм на пролиферативную активность ЛПК и продукцию ими цитокинов. Авторы показали минимальный эффект наночастиц [26]. Суммируя полученные нами и другими авторами данные, SiFeNP разного размера не оказывают значительного эффекта на ЛПК и не проникают в них.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение SiFeNP

Наночастицы SiFeNP были получены методом фемтосекундной (фс) лазерной абляции в жидкости, ранее разработанным нашей группой и использовавшимся для синтеза коллоидных растворов как неорганических [27], так и органических NP [28]. Схематическое изображение экспериментальной установки для лазерной абляции представлено на рис. 1*а*. Мишень из силицида железа $FeSi_2$ (соотношение материала в мишени примерно составляло 60 : 40 по Si : Fe) облучалась излучением, генерируемым Yb:KGW лазером (длина волны 1030 нм, длительность импульса 270 фс, энергия импульса 30 мкДж, частота следования импульсов 100 кГц, диаметр пучка 3 мм, модель ТЕТА 10, Авеста, Москва, Россия) и сфокусированным 75 мм линзой на поверхности мишени. Сама мишень во время лазерной абляции была зафиксирована в кварцевой кювете объемом 60 мл, заполненной ацетоном (“Ясхим”, ГОСТ 2768-84, чистота 99.5%). Толщина слоя жидкости перед мишенью составляла 5 мм. Длительность процесса абляции составляла 15 минут. Во время синтеза лазерный луч сканировал поверхность мишени со скоростью 4 м/с для предотвращения образования абляционных кратеров и увеличения эффективности процесса.

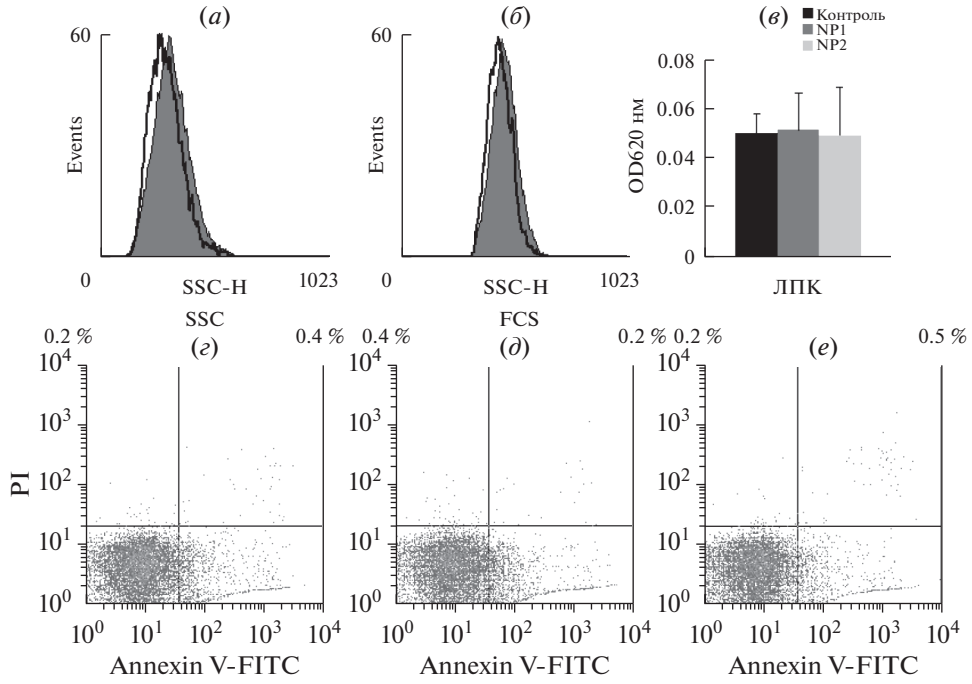


Рис. 6. Анализ взаимодействия наночастиц SiFe с лимфоцитами периферической крови (ЛПК) человека. (*а*–*б*) Гранулярность (*а*) и размер (*б*) ЛПК до (серая гистограмма) и после инкубации 48 ч с наночастицами NP1. (*в*) Оптическая плотность (620 нм) ЛПК до (контроль) и после 24 ч инкубации с наночастицами NP1 и NP2. (*г*–*е*) Анализ индукции апоптоза ЛПК до (*г*) и после 48 ч инкубации с NP1 (*д*) и NP2 (*е*).”

Выбор ацетона в качестве среды для приготовления SiFeNP обусловлен тем экспериментальным фактом [29], что материалы, склонные к образованию оксидов (в данном случае кремний и железо) при абляции в ацетоне практически не окисляются и образуют сферические наночастицы SiFe (рис. 1*а*), тогда как быстрое окисление при абляции в воде приводит к формированию значительного количества неструктурированных моно элементных оксидов в виде наноразмерных “хлопьев”.

Для разделения размерных фракций и необходимой для проведения биологических тестов смены растворителя с ацетона на воду использовался метод последовательного центрифугирования. На первом этапе было проведено центрифугирование (Eppendorf USA) исходного коллоидного раствора SiFeNP при 200 *g* в течении 30 минут. Осадок содержал наночастицы размером 150 нм. Редиспергирование этого осадка в воде привело к получению фракции NP2. Супернатант, оставшийся после первого шага, повторно центрифугировали при 2000 *g* в течении 30 минут. Осадок после второго шага центрифугирования содержал SiFeNP размером 100 нм. Редиспергирование этого осадка в воде привело к получению фракции NP1.

Размерные и морфологические свойства синтезированных SiFeNP обеих размерных фракций были определены с использованием сканирующего просвечивающего электронного микроскопа (TESCAN MAIA 3, Чешская республика), работающего при ускоряющих напряжениях 0.1–30 кВ. Образцы для электронной микроскопии были подготовлены путем размещения 1 мкл коллоидного раствора SiFeNP на подложке из германия и последующей сушки капли при нормальных условиях.

Определение размера и дзета-потенциала наночастиц

Диаметр NP определяли методом динамического светорассеяния (90 Plus Particle Size Analyzer, Brookhaven Instruments Corporation, Vernon Hills, IL, США). Все измерения проводились с использованием лазера 661 нм при комнатной температуре с углом рассеяния 90°. Дзета-потенциал (ζ) определяли с использованием идентичного оборудования с дополнительным аппаратом ZetaPALS.

Определение внутриклеточной локализации SiFeNP

Для определения внутриклеточной локализации ЭК после инкубации с наночастицами обрабатывали трипсином для суспендирования и, одновременно, освобождения от наночастиц, связанных с поверхностью ЭК. После центрифугирования осадки клеток в контроле имели белый, а в опыте с частицами – серый цвет, что показывает внутри-

клеточное накопление наночастиц. Для количественного определения суспензию в физрастворе разносили по лункам 96-луночного (Costar, USA) плоскодонного планшета и анализировали поглощение в видимом диапазоне при 620 нм на спектрофотометре (Multiscan FC, USA). Для анализа поглощения частиц суспензионными ЛПК клетки переводили в физраствор и разносили по лункам планшета для аналогичного анализа.

Клеточные линии

Карцинома поджелудочной железы человека COLO-357 и карцинома толстой кишки SW620 выращены в среде DMEM с добавлением 7% фетальной телячьей сыворотки (HyClone, США), пенициллин-стрептомицина и L-глютамина (все из ПанЭко, Москва, Российская Федерация) (культуральная среда). Клетки пассировали путем трипсинизации с использованием раствора трипсин/ЭДТА (ПанЭко, Москва, Российская Федерация) два раза в неделю. ЛПК культивировали в среде на основе RPMI-1640 с теми же добавками.

MTT-анализ

Цитотоксический эффект SiFeNP оценивали с помощью стандартного теста 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2H-тетразолий бромида (MTT, Сигма), описанного ранее [30]. Для постановки теста NP1 и NP2 разводили в широком диапазоне концентраций, начиная с 20 мкг/мл, в культуральной среде в 96-луночном плоскодонном планшете (Costar, USA) в 100 мкл. Клетки в количестве 10 тыс./лунку вносили во все лунки в 100 мкл. Планшеты инкубировали с CO_2-инкубаторе (37°C, 5% CO_2) в течение 72 ч. MTT добавляли по 10 мкл/лунку (5 мг/мл) на последние 3 часа инкубации. После окончания инкубации культуральную среду стряхивали и вносили по 100 мл диметилсульфоксида для растворения формазана. Ингибирующий индекс (II) был рассчитан как $II = [1 - (OD_{опыт}/OD_{контроль})]$, где OD–оптическая плотность растворенного формазана.

Проточная цитометрия

Все измерения проводили на проточном цитометре FACScan (BD, USA). Для оценки количества мертвых клеток в культурах с наночастицами клетки снимали с подложки трипсином, переводили в физраствор, в который добавляли 50 мкл йодистого пропидия (PI) (5 мкг/мл) и анализировали методами прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния для определения размера и гранулярности клеток соответственно в популяции отрицательных по PI клеток. Оценку доли мертвых клеток (положительных по PI) оценивали по свечению в красной области контрольных клеток и клеток после инкубации с наночастицами 24 ч. Подсчитывали отношение доли PI+ клеток в опыте к контролю (Индекс PI).

Анализ синтеза АФК проводили с использованием АФК-чувствительного красителя 2',7'-диацетат дихлордигидрофлуоресцеина (DCFH-DA или DCF) (Sigma Aldrich, USA). Исходно DCF бесцветный, в клетках гидролизуется клеточными эстеразами в присутствии перекиси водорода до флуоресцентного 2',7'-дихлорфлуоресцеина. Внутриклеточную продукцию оценивали в канале FL1.

Анализ апоптоза ЛПК, вызванного наночастицами, оценивали с помощью окраски клеток флуоресцеин-меченным аннексином V (BD, USA). Аннексин V обычно используется для обнаружения апоптотических клеток благодаря его способности связываться с фосфатидилсерином, маркером апоптоза, когда он находится на внешней стороне плазматической мембраны. В пробы также добавляли PI, что позволяет разделить апоптотические и некротические клетки. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения WinMDI 2.8.

Анализ секреторных АФК

Для анализа секреторных АФК наночастицы разводили в широком диапазоне концентраций в 100 мкл культуральной среды на плоскодонных 96-луночных планшетах (Costar, USA). Клетки в количестве 10 тыс./лунку вносили во все лунки и оставляли инкубировать 4, 8 или 20 ч. DCF вносили вместе с клетками. Результат анализировали на флуоресцентном ридере Glomax Multi (Promega, USA) с фильтром 488 нм. Данные представлены как отношение оптической плотности в опыте к контролю, где 1 означает отсутствие эффекта.

Анализ лизосомального мембранного потенциала

Для анализа потенциала мембран лизосом использовали pH-чувствительный трекер лизосом LysoTracker® Red DND-99 (Life Technologies, USA). ЭК инкубировали с наночастицами 4, 8 и 24 ч аналогично как описано выше при определении АФК, трекер вносили на последние 30 мин инкубации. Результат анализировали на флуоресцентном ридере Glomax Multi (Promega, USA) с фильтром 525 нм. Данные приведены как разница оптической плотности в опыте минус контроль (Дельта LTR), где 0 означает отсутствие эффекта.

Выделение лимфоцитов периферической крови (ЛПК)

Кровь с добровольного согласия здоровых доноров забирали в вакуумные пробирки с ЭДТА (Vacplus, Россия). Кровь разводили в 2 раза фи-

зиологическим раствором (ФР), наслаивали на градиент фиколла (ПанЭко, Россия) и центрифугировали при 2.3 тыс. об./мин 20 минут. Лимфоциты из интерфазы отмывали 3 раза в ФР, подсчитывали количество клеток на камере Горяева и переводили в культуральную среду. ЛПК инкубировали с наночастицами в концентрации 10 мкг/мл 48 ч. Для анализа апоптоза клетки отмывали и переводили в ФР, метили аннексин V-ФИТЦ и анализировали на проточном цитометре как описано выше.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-14-00171. С.В.С. благодарит грант РФФИ 17-00-00394.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все международные стандарты при работе с людьми были соблюдены (кровь забиралась с добровольного согласия здоровых доноров).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lillo C.R., Natalia Calienni M., Gorojod R.M., Rivas Aiello M.B., Rodriguez Sartori D., Prieto M.J., Alonso S. del V., Kotler M.L, Gonzalez M.C., Montanari J.* // Nanomedicine. 2018. V. 13. P. 1349–1370. https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0010
2. *Santos H.A., Mäkilä E., Airaksinen A.J., Bimbo L.M., Hirvonen J.* // Nanomedicine. 2014. V. 9. P. 535–554. doi.org/ https://doi.org/10.2217/nnm.13.223
3. *Ischenko A.A., Fetisov G.V., Aslanov L.A.* // Nanosilicon: Properties, Synthesis, Applications, Methods of Analysis and Control. CISP, CRC, Taylor&Francis group, NY, 2014, P. 714. https://doi.org/10.1201/b17170
4. *Lei W., Sun C., Jiang T., Gao Y., Yang Y., Zhao Q., Wang S.* // Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 2019. V. 105. P. 110103. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110103
5. *Lio D.C.S., Liu C., Oo M.M.S., Wiraja C., Teo M.H.Y., Zheng M., Chew S.W.T., Wang X., Xu C.* // Nanoscale. 2019. V. 11. P. 17041–17051. https://doi.org/10.1039/C9NR06303J
6. *Li S., Zhang Y., He X.W., Li W.Y., Zhang Y.K.* // Talanta. 2020. V. 209. P. 120552. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120552
7. *Wu Y., Xu Z., Sun W., Yang Y., Jin H., Qiu L., Chen J., Chen J.* // Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 2019. V. 103. P. 109831. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109831
8. *Jia Y., Zhang P., Sun Y., Kang Q., Xu J., Zhang C., Chai Y.* // Nanomedicine. 2019. V. 21. P. 102040. https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102040
9. *Li T., Li X.L., Hu S.X., Wu J.* // J. Photochem. Photobiol. B. 2019. V. 197. P. 111515. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111515
10. *Kargina Y.V., Perepukhov A.M., Kharin A.Y., Zvereva E.A., Koshelev A.V., Zinovyev S.V., Maximychev A.V., Alykova A.F., Sharonova N.V., Zubov V.P., Gulyaev M.V., Pirogov Y.A., Vasiliev A.N., Ischenko A.A., Timoshenko V.Y.* // Physica Status Solidi (A) Applications and Materials. 2019. V. 216. P. 1800897. https://doi.org/10.1002/pssa.201800897
11. *Klein S., Wegmann M., Distel L.V.R., Neuhuber W., Kryschi C.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018. V. 498. P. 855–861. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.070
12. *Liu N., Tang M.* // J. Appl. Toxicol. 2020. V. 40. P. 16–36. https://doi.org/10.1002/jat.3817
13. *Li J., Yang H., Sha S., Li J., Zhou Z., Cao Y.* // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2019. V. 186. P. 109770. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109770
14. *Kim W., Kim W.K., Lee K., Son M.J., Kwak M., Chang W.S., Min J.K., Song N.W., Lee J., Bae K.H.* // Int. J. Nanomedicine. 2019. V. 14. P. 7375–7387. https://doi.org/10.2147/IJN.S224183
15. *Rubio L., Pyrgiotakis G., Beltran-Huarac J., Zhang Y., Gaurav J., Deloid G., Spyrogianni A., Sarosiek K.A., Bello D.* // Part Fibre Toxicol. 2019. V. 16. P. 40. https://doi.org/10.1186/s12989-019-0325-1
16. *Mendez N., Liberman A., Corbeil J., Barback C., Viveros R., Wang J., Wang-Rodriguez J., Blair S.L., Mattrey R., Vera D., Trogler W., Kummel A.C.* // Nanomedicine. 2017. V. 13. P. 933–942. https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.10.018
17. *Singh M.P., Atkins T.M., Muthuswamy E., Kamali S., Tu C., Louie A.Y., Kauzlarich S.M.* // ACS Nano. 2012. V. 6. P. 5596–5604. https://doi.org/10.1021/nn301536n
18. *Napierska D., Rabolli V., Thomassen L.C., Dinsdale D., Princen C., Gonzalez L., Poels K.L., Kirsch-Volders M., Lison D., Martens J.A., Hoet P.H.* // Chem. Res. Toxicol. 2012. V. 25. P. 828–837. https://doi.org/10.1021/tx200361v
19. *Bhattacharjee S., Rietjens I.M., Singh M.P., Atkins T.M., Purkait T.K., Xu Z., Regli S., Shukaliak A., Clark R.J., Mitchell B.S., Alink G.M., Marcelis A.T., Fink M.J., Veinot J.G., Kauzlarich S.M., Zuilhof H.* // Nanoscale. 2013. V. 5. P. 4870–4883. https://doi.org/10.1039/c3nr34266b
20. *Svetlichnyi V.A., Shabalina A.V., Lapin I.N., Goncharova D.A., Kharlamova T.S., Stadnichenko A.I.* // Applied Surface Science. 2019. V. 467–468. P. 402–410. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.10.189
21. *Baati T., Al-Kattan A., Esteve M.A., Njim L., Ryabchikov Y., Chaspoul F., Hammami M., Sentis M., Kabashin A.V., Braguer D.* // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 25400. https://doi.org/10.1038/srep25400

22. *Zubareva A.A., Shcherbinina T.S., Varlamov V.P., Svirshchevskaya E.V.* // Nanoscale. 2015. V. 7. P. 7942–7952. https://doi.org/10.1039/c5nr00327j
23. *Vis B., Hewitt R.E., Faria N., Bastos C., Chappell H., Pele L., Jugdaohsingh R., Kinrade S.D., Powell J.J.* // ACS Nano. 2018. V. 12. P. 10843–10854. https://doi.org/10.1021/acsnano.8b03363
24. *Al Soubaihi R.M., Furesi G., Saoud K.M., Al-Muhtaseb S.A., Khatat A.E., Delogu L.G.* // Colloids Surf B Biointerfaces. 2018. V. 172. P. 779–789. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.022
25. *Jiménez-Villarreal J., Rivas-Armendáriz D.I., Arellano Pérez-Vertti R.D., Olivas Calderón E., García-Garza R., Betancourt-Martínez N.D., Serrano-Gallardo L.B., Morán-Martínez J.* // Genet. Mol. Res. 2017. V. 16. https://doi.org/10.4238/gmr16019206
26. *Zasonska B.A., Líšková A., Kuricova M., Tulinska J., Pop-Georgievski O., Čiampor F., Vavra I., Dušinska M., Ilavska S., Horvathova M., Horák D.* // Croat. Med. J. 2016. V. 57. P. 165–178. https://doi.org/10.3325/cmj.2016.57.165
27. *Al-Kattan A., Nirwan V., Popov A., Ryabchikov Y., Tselikov G., Sentis M., Fahmi A., Kabashin A.V.* // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. 1563. https://doi.org/10.3390/ijms19061563
28. *Lim C.K., Popov A., Tselikov G., Heo J., Pliss A., Kim S., Kabashin A.V., Prasad P.N.* // Advanced Optical Materials. 2018. V.6. P. 1800164. https://doi.org/10.1002/adom.201800164
29. *Popov A., Tselikov G., Dumas N., Berard C., Metwally K., Jones N., Al-Kattan A., Larrat B., Braguer D, Mensah S., Da silva A., Estève M.A., Kabashin A.V.* // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 1194. https://doi.org/10.1038/s41598-018-37519-1
30. *Mosmann T.* // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. P. 55–63. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4

Interaction of SiFe Nanoparticles with Epithelial and Lymphoid Cells

N. V. Sharonova*, **, E. V. Svirshchevska*, A. A. Popov*, N. V. Karpov*, G. V. Tikhonovskiy*, A. Yu. Zakharkiv*, S. V. Sizova***, V. Yu. Timoshenko*, S. M. Klimentov*, and V. A. Oleinikov*, ***, #**

#Phone: +7 (910) 409-84-55; fax: +7 (495) 330-40-11; e-mail: voleinik@mail.ru

**National Research Nuclear University "MEPhI", Kashirskoe sh. 31, Moscow, 115409 Russia*

***MIREA-Russian Technological University (Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies) prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia*

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

Silicon and silicon-based nanoparticles (SiNP) attract scientific attention due to the biocompatibility and assimilation of silicon by body tissues. Iron-doped SiNP (SiFeNP) allow the use of ferromagnetic properties of iron for NP detection and the possibility of therapeutic application of SiFeNP. The purpose of this work was to analyze the interaction of SiFeNP with epithelial cells (EC) COLO357 and SW620 and human peripheral blood lymphocytes (PBL). SiFeNP were obtained by laser ablation and divided into NP1 and NP2 of 100 and 150 nm size, respectively. Cytotoxicity, apoptosis induction, reactive oxygen species (ROS) production, and lysosome metabolism were analyzed using *in vitro* methods. It was revealed that EC efficiently incytosed both types of NP, which resulted in the increase in the granularity of cells. NP did not cause apoptosis or EC necrosis, but accumulated in lysosomes, which led to a decrease in the membrane potential of lysosomes. In turn, a decrease in the level of EC metabolism led to a gradual (24 h) increase in ROS production by 10–15%. In this case, NP1 caused more ROS than NP2, and more accumulated in the EC, which may be the result of a difference in the particle size. SiFeNP did not interact with PBL. Thus, the total cytotoxicity of SiFeNP did not exceed 20%, which is associated with a decrease in lysosome metabolism and insignificant ROS production.

Keywords: iron-containing silicon nanoparticles, cytotoxicity, apoptosis, membrane potential of lysosomes, ROS production

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 746–752

УДК 571.27

ОТРИЦАТЕЛЬНАЯ КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ ЕСТЕСТВЕННЫМИ АНТИТЕЛАМИ ЧЕЛОВЕКА, НАПРАВЛЕННЫМИ К ГЛИКОТОПАМ Galβ1-3GlcNAc И Galβ1-4GlcNAc

© 2020 г. Н. В. Шилова*, **, *, И. М. Рыжов*, М. М. Зиганшина**, А. С. Ракитько****, М. Е. Хуфлейт*****, Н. В. Бовин*, #**

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

***Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Минздрава РФ, Россия, 117997 Москва, ул. Академика Опарина, 4*

****ООО Семиотик, Россия, 117437 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

*****МГУ им. М.В. Ломоносова, механико-математический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1А*

******Университет Вармы и Мазури, факультет медицинских наук, Польша, 10-082 Ольштын, ул. Варшавская, 30*

Поступила в редакцию 26.03.2020 г.
После доработки 06.04.2020 г.
Принята к публикации 14.04.2020 г.

На когорте из 106 доноров мы проанализировали корреляции в связывании естественными антителами человека гликанов в составе гликанового эррея. Наряду с тривиальными взаимосвязями (между структурно схожими гликанами) мы обнаружили высокую положительную корреляцию между совершенно неродственными гликанами. Наиболее интригующей среди отрицательных является корреляция средней силы (близкая к –0.5) между антителами к Galβ1-3GlcNAc и антителами к лактозаминам $(Gal\beta1\text{-}4GlcNAc)_n$. Причина функционального антагонизма между этими антителами пока не ясна.

Ключевые слова: естественные антитела, гликаны, Le^c, полилактозамины, онкологические заболевания, гликочип

DOI: 10.31857/S0132342320060299

ВВЕДЕНИЕ

Репертуар естественных антигликановых антител человека (АГАТ) складывается из константных (которые есть почти у всех людей) и вариабельных (таких как к антигенам групп крови) иммуноглобулинов [1]. Стабильность “анти-гликома”, по-видимому, связана с эволюционным отбором наиболее важных для врожденного иммунитета антител, закрепленных в геноме [2]. Например, уровень[1] антител к гликанам Galα1-4GlcNAc, GalNAcα1-3GalNAc, Fucα1-4GlcNAc, Galβ1-3GlcNAc за редкими исключениями высок [3], в то время как специфические антитела к сиало-эпитопам практически отсутствуют [4]. Репертуар АГАТ сложился в результате стимуляции иммунной системы экзогенными патогенами (в первую очередь бактериями), а также необходимости элиминировать постоянно появляющиеся эндогенные аберрантные клетки. Бактерии антигенно изменчивы – штаммы одного и того же вида могут иметь совершенно разные полисахариды; эволюции нужно было генетически закрепить иммуноглобулины против нескольких разновидностей особо опасных бактерий, несмотря на противоположную тенденцию – стремление избежать их избыточности. Это значит, что между некоторыми из естественных антител можно ожидать положительную корреляцию, когда увеличенный (уменьшенный) титр одного антитела сопровождается увеличением (уменьшением) титра второго при исследовании статистически достаточной когорты индивидов. По-видимому, такой же параллелизм можно ожидать и в элиминировании опухолевых клеток. Не столь очевидно наличие отрицательной корреляции, то есть, когда высокий титр одного антитела с высокой достоверностью сопровождается низким титром другого.

С практической точки зрения, выявление корреляций между АГАТ важно при поиске диагностических сигнатур (комбинации антител, специфической для каждой определенной патологии),

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-71-38; эл. почта: professorbovin@yandex.ru).

[1] В данной работе “уровень” антител или титр – это величина, равная произведению их аффинности на концентрацию.

что особенно перспективно для сложных системных заболеваний, таких как рак и большие акушерские синдромы, когда один маркер принципиально не дает высокой диагностической чувствительности и специфичности [5–8]. Разнообразие АГАТ в крови высоко [1, 3], а с помощью гликанового эррея в крови больных можно определять сотни специфичностей одновременно, что делает сигнатурный подход реализуемым [9]. Чтобы понять, почему те или иные антитела попадают в диагностическую сигнатуру, и связано ли их появление (или исчезновение) в крови больного с патологией непосредственным образом, нужно как минимум идентифицировать их молекулярные мишени. А чтобы приблизиться к их нахождению, необходимы данные по взаимосвязям АГАТ разной специфичности, полученным на достаточно представительной когорте доноров. В данной работе мы провели корреляционный и кластерный анализ большого массива данных гликоэррея (когорта >100 здоровых женщин [3]) и описали найденные взаимосвязи между парами АГАТ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кластеризация

В данной работе мы заново проанализировали опубликованные ранее данные [3, 10], полученные с использованием гликанового эррея, включающего 211 синтетических гликанов. Поскольку количество кластеров нам заранее было неизвестно, был использован метод иерархической кластеризации. В качестве матрицы расстояний брали матрицу $Q = 1 - \mathrm{cor}(X)[i,j]$, где $\mathrm{cor}(X)[i,j]$ – коэффициент корреляции между гликанами i и j. Для выделения достоверных кластеров мы использовали метод бутстрепинга [11]. Вычисления производились с помощью R-пакета pvclust; число случайно сгенерированных выборок на основе имеющихся данных (бутстреп ресамплинг) составляло 20000. В качестве кластеров рассматривали группы гликанов, для которых величина $p \geq 0.99$. Всего было выявлено 23 кластера, внутри которых АГАТ достоверно коррелировали (табл. 1).

Порог объединения в кластер определяется значением p, при этом внутри кластера гликаны не обязательно очень хорошо коррелируют между собой, как это видно из табл. 1; здесь рассматривались корреляции вплоть до ~0.5. Более важно было отличие на уровне целых кластеров, то есть одного кластера от другого.

Приведенные выше корреляции, как между кластерами, так и между индивидуальными АГАТ внутри них, были положительны. Общую картину как положительных, так и отрицательных корреляций можно увидеть на гистограмме (рис. 1),

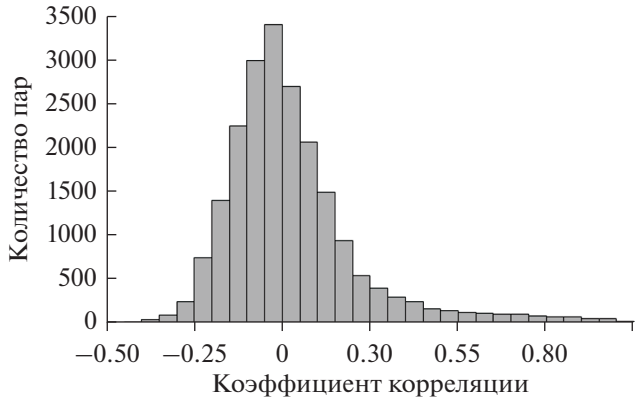


Рис. 1. Позитивные и, в особенности, негативные корреляции между АГАТ являются редкими событиями.

которая говорит о редкой встречаемости высоких корреляций.

Большая часть этих 23 кластеров тривиальна, к этой категории мы относим следующие случаи.

1) Антитела к гликанам, отличающихся только спейсером, как, например, кластеры # 15 и 17;

2) Антитела к гомополимерам, таким как хитоолигосахариды (# 13 и 14);

3) Антитела к производному N-гликолилнейраминовой кислоты в паре с производным N-ацетилнейраминовой кислоты (кластер #3);

Корреляции внутри кластеров этих трех типов высоки.

4) Антитела к гликанам, имеющих общий моносахаридный остаток, например, кластер #22, в который вошли два гликана с коровым остатком Galβ и, собственно, Galβ, а также кластер #2, объединяющий молекулы с коровым мотивом 3Galβ1-4GlcNAcβ; коэффициенты корреляции в таких случаях могут быть как низкими (очень небольшой эпитоп, кластер #22), так и высокими (#2).

Наибольший интерес представляют такие кластеры АГАТ, в которых структуры гликанов совсем непохожи. Можно предположить два механизма корреляции антител к непохожим антигенам. Первый – одни и те же антитела связываются со взаимно мимикрирующими антигенами. Второй – не структурная, а функциональная сцепленность, например, антитела к разным молекулам одного и того же патогена. Высокая нетривиальная корреляция обнаружилась лишь одна, между гликанами кластера #1, в который вошли GalNAcα1-4(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 и $(\mathrm{GlcNAc}\beta1)_3$-3,4,6-GalNAcα-sp3. Оба гликана являются неприродными, поэтому предполагать их функциональную сцепленность бессмысленно. Что касается взаимного мимикрирования, то можно предположить, что антитела узнают определенное про-

Таблица 1. Выявленные кластеры корреляции

Кластер #	Структура	Средний коэффициент корреляции внутри кластера
1	GalNAcα1-4(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ-sp3*	0.99
1	$(GlcNAc\beta1)_3$-3,4,6-GalNAcα-sp3	
2	GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	0.97
2	3-O-SuGalβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	
2	$(Gal\beta1\text{-}4GlcNAc\beta1\text{-}3)_2$-Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	
3	Neu5Acα2-6GalNAcα-sp3	0.95
3	Neu5Gcα2-6GalNAcα-sp3	
4	GlcNAcα1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	0.95
4	GlcNAcα1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	
5	$(Glc\alpha1\text{-}6)_3\beta$-sp4	0.94
5	$(Glc\alpha1\text{-}6)_4\beta$-sp4	
6	3-O-Su-Galβ1-3GlcNAcβ-sp3	0.91
6	Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ-sp3	
7	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-sp4	0.91
7	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-sp4	
8	Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-sp4	0.89
8	Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-sp4	
9	GlcNAcβ1-3GalNAcα-sp3	0.87
9	GlcNAcβ1-6(GlcNAcβ1-3)GalNAcα-sp3	
10	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ-sp3	0.86
10	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ-sp5	
11	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ-sp3	0.90
11	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ-sp5	
11	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	
12	Galα1-4GlcNAcβ-sp3	0.84
12	Galα1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	
13	GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-sp4	0.81
13	GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Asn	
14	GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-sp4	0.84
14	$(GlcNAc\beta1\text{-}4)_5\beta$-sp4	
14	$(GlcNAc\beta1\text{-}4)_6$-sp4	
15	6-O-Su-Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	0.76
15	6-O-Su-Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	
16	Galβ1-4GlcNAcβ1-3GalNAcα-sp3	0.76
16	Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)GalNAcα-sp3	
17	4-O-Su-Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	0.86
17	4-O-Su-Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	
17	4,6-O-Su_2-Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	
17	4,6-O-Su_2-Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	
18	Neu5Acβ-sp9	0.73
18	Neu5Acα2-8Neu5Acβ-sp9	
19	Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ-sp4	0.69
19	Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3Galβl-4Glcβ-sp4	
20	Neu5Gcβ2-6Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	0.63
20	Neu5Acβ2-6Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	
21	Neu5Acβ2-6GalNAcα-sp3	0.57
21	Galβ1-3(Neu5Acβ2-6)GalNAcα-sp3	
22	Galβ-sp3	0.49
22	Neu5Acα2-6Galβ-sp3	
22	GlcAβ1-6Galβ-sp3	
23	GalNAcβ1-3Galβ-sp3	0.65
23	Fucα1-2(GalNAcβ1-3)Galβ-sp3	

* sp2 = $-OCH_2CH_2NH-$; sp3 = $-OCH_2CH_2CH_2NH-$; sp4 = $-NHCOCH_2NH-$; sp5 = $-O(CH_2)_3NHC(O)(CH_2)_5NH-$, sp9 = = $OCH_2C_6H_4$-p-$NHC(O)CH_2NH-$.

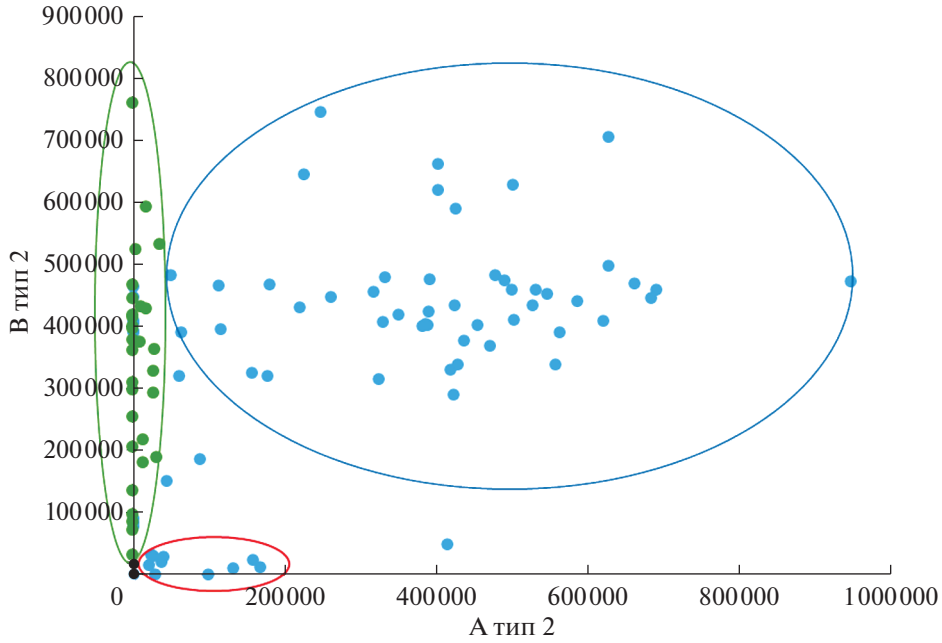


Рис. 2. Встречаемость антител, направленных к тетрасахаридам групп крови GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ (А тип 2) и Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ (В тип 2). По осям абсцисс и ординат – относительные единицы флуоресценции, уменьшенные в тысячу раз. Зеленые точки соответствуют группе крови III(B), красные – II(A), голубые – I(O), черные – IV(AB).

странственное расположение метильных групп, которых в первом гликане три, а во втором четыре, и они размещены довольно компактно. Ранее мы нашли похожий эффект при узнавании естественными антителами человека структурно совершенно разных сильно метилированных полисахаридов [12].

Существует ли корреляция между антителами групп крови A и B?

По имеющейся выборке доноров коэффициент корреляции Пирсона между двумя гликанами GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ (А тип 2) и Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ (В тип 2) оказался равен 0.43, что говорит о наличии слабой положительной корреляции. Наличие или отсутствие антител к этим гликанам определяет группу крови человека по системе ABO. Насколько она достоверна с биологической точки зрения?

Рис. 2 показывает, что когорта из 106 изученных доноров разбивается на четыре группы по интенсивности сигналов к гликанам А тип 2 и В тип 2. Эти группы (доноров четвертой группы было только двое, что согласуется с известной низкой частотой встречаемости[2] индивидуумов группы крови AB) соответствуют четырем группам системы ABO. С математической точки зрения, корреляция предполагает наличие обоих параметров, которые однонаправленно изменяются. В случае с антителами к антигенам групп крови, один из параметров равен нулю (так, у доноров группы крови B уровень анти-A антител широко варьируется, а анти-B антител нет вовсе), поэтому отрицательной корреляции быть не может, а положительная корреляция возникла вследствие того, что в рассматриваемой когорте преобладающее большинство индивидуумов имеет, по-видимому, группу I(0), для которой характерно наличие ненулевых уровней антител к обоим рассматриваемым антигенам, флуктуация в сигналах к которым и позволила выявить математическую (но не биологическую) взаимосвязь. То же самое следует ожидать и для других связанных с углеводными антигенами систем групп крови, таких как Lewis и Pp (есть и другие системы, но там представленность одного из параметров, то есть фенотипа, составляет около 0.99).

Взаимодействия между кластерами

Было оценено также и межкластерное взаимодействие (рис. 3). Поскольку мы задали высокое пороговое значение p, алгоритм не объединил кластеры похожих гликанов в общий кластер большего размера. Тем не менее, есть кластеры, которые можно было бы объединить в более крупный, например, кластеры #7 и #8, коэффициент корреляции между ними составил 0.71, в то время как внутри этих малых кластеров корреляция была 0.91

[2] http://bloodcenter.stanford.edu/education/blood_types.php.

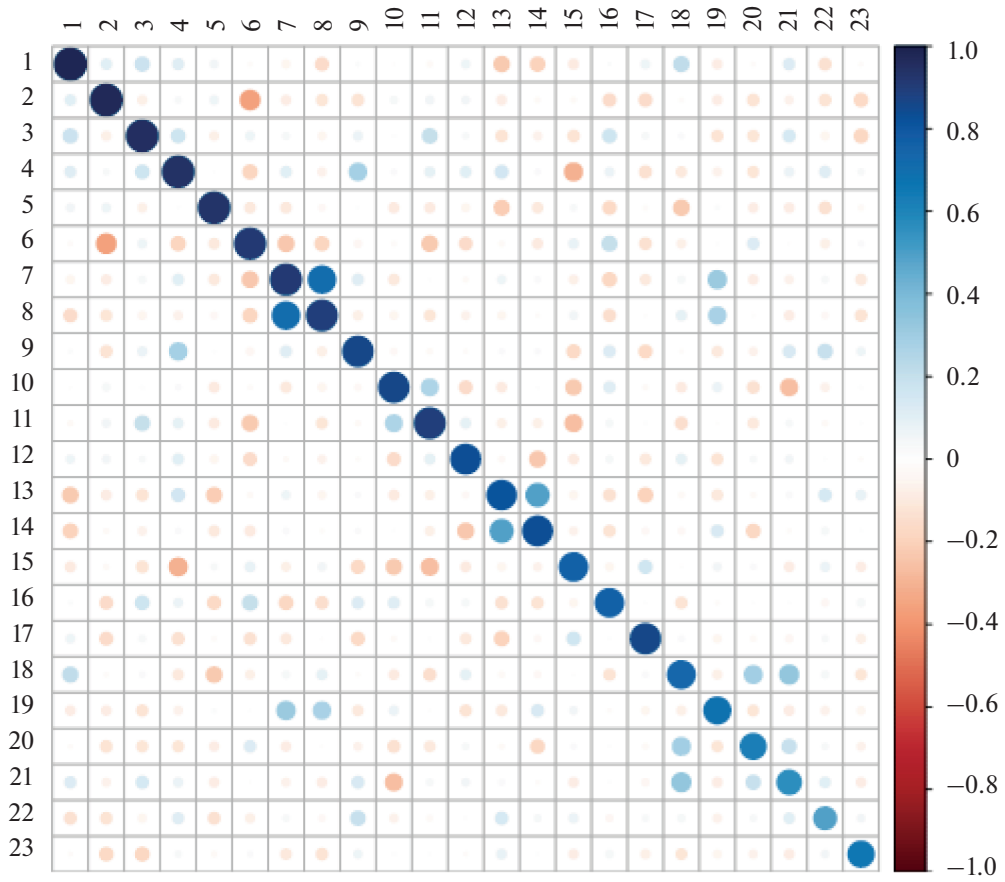


Рис. 3. Межкластерное взаимодействие обнаруженных 23 кластеров. Точки на диагонали обозначают величину коэффициента корреляции внутри кластера *i* (*i* – номер строки/столбца). Точки вне диагонали обозначают среднюю величину коэффициента корреляции между кластерами. Синий цвет соответствует положительной, а коричневый – отрицательной корреляции, градация цвета приведена справа.

и 0.89 соответственно. Подобная ситуация наблюдается для пары #13 и #14, коэффициент корреляции между ними 0.50. Структурная схожесть гликанов в обоих случаях очевидна (табл. 1).

Существуют ли отрицательные корреляции?

Оказалось, что на уровне кластеров наблюдается отрицательная корреляция между #6 и #2 (коэффициент корреляции составил –0.36, это лучшая из обнаруженных величин). На уровне отдельных пар гликанов также найдено несколько примеров (табл. 2), и корреляция в них находилась в интервале –0.44...–0.47, т.е. приближалась к корреляциям средней силы.

Все четыре пары имеют очевидный общий структурный мотив, отличающий “левые” гликаны от “правых”, а именно, гликаны из левого столбца основаны на так называемом коре 2, то есть, N-ацетиллактозамине (LN) [13], а гликаны из правого столбца относятся к кору 1, то есть к Galβ1-3GlcNAc (Le^c) [14]. Отметим, что эта закономерность проявляется только для незамещенных олиголактозаминовых цепей, и что единичного LN для связывания антител недостаточно. Важно также, что антитела, связывающиеся на чипе с гликанами 3-O-Su-Galβ1-3GlcNAcβ и

Таблица 2. Лучшие отрицательные корреляции между индивидуальными гликанами

Кор 2	Кор 1	Корреляция
Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 , **LN_2**	Galβ1-3GlcNAcβ-sp2, **Le^c**	–0.44
$(Galβ1\text{-}4GlcNAcβ1\text{-}3)_2$-Galβ1-4GlcNAcβ-sp3, **$LN_3$**	Galβ1-3GlcNAcβ-sp2, **Le^c**	–0.42
Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3, **LN_2**	3-O-Su-Galβ1-3GlcNAcβ-sp3, **Su-Le^c**	–0.42
Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3, **LN_2**	Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ-sp3, **SiaLe^c**	–0.47

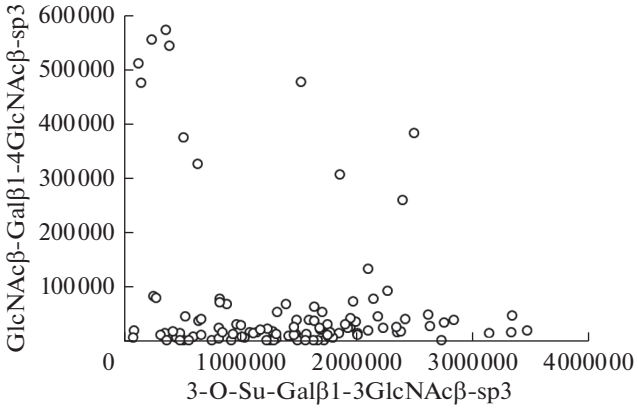


Рис. 4. Реципрокные взаимоотношения между анти-3-O-Su-Galβ1-3GlcNAc и анти-GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc антителами. По осям абсцисс и ординат – относительные единицы флуоресценции, уменьшенные в тысячу раз.

Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ, на самом деле почти идентичны антителам к "родительскому" дисахариду Le^C, что было показано с помощью их аффинного выделения [15]. Имея в виду все вышесказанное, мы выбрали для дальнейшего рассмотрения первую пару из табл. 2.

Чтобы наглядно продемонстрировать наличие реципрокных взаимоотношений, мы приводим диаграмму (рис. 4), на которой видно, что уровни антител к двум гликанам (пример из табл. 2) редко оказываются вблизи диагонали.

Биологический смысл антагонизма между анти-Galβ1-3GlcNAc (Le^C) and анти-Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc (LN_2) антителами пока неясен. Вряд ли это "физическая" конкуренция за связывание антител с двумя соседними эпитопами одной и той же молекулы, это больше похоже на функциональный антагонизм. Антитела к Le^C выполняют функцию надзора за возникновением опухолевых клеток, у больных раком молочной железы наблюдается их дефицит [16, 17]. Возможно, анти-LN_2 восполняют этот дефицит, в пользу чего говорят данные о повышенной экспрессии линейных полилактозаминовых цепей при карциномах (а в нормальных тканях они представлены слабо) [18, 19]. Наличие антител к полилактозаминам является фактором риска, они относятся к так называемым холодовым агглютининам (ауто-антителам), а у беременных могут вызвать ответ к плоду, так как полилактозаминовые цепи широко представлены у эмбриона (после рождения они трансформируются в разветвленные), иными словами, являются онко-эмбриональными антигенами [17]. То есть, при дефиците антител к Le^C, антитела к полилактозаминам появляются (точнее, не исчезают при взрослении) как их суррогат. Более убедительной гипотезы у нас нет.

Таким образом, при изучении антигликановых естественных антител в большой когорте доноров выявляются как положительные, так и отрицательные корреляции между антителами, которые бывают нетривиальными, когда коррелирующие антитела направлены к гликанам неродственной структуры. Причины возникновения таких корреляций предстоит выяснить.

ФОНДОВАЯ ПОДДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Государственного контракта № г.р. АААА-А18-118053190022-8 (М.М. Зиганшина и Н.В. Шилова) и при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований в рамках проекта № 18-33-00795 (И.М. Рыжов).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bovin N.V.* // Biochemistry (Moscow). 2013. V. 78. P. 786–797. https://doi.org/10.1134/S0006297913070109
2. *Khasbiullina N.R., Bovin N.V.* // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 820–835. https://doi.org/10.1134/S0006297915070032
3. *Huflejt M.E., Vuskovic M., Vasiliu D., Xu H., Obukhova P., Shilova N., Tuzikov A., Galanina O., Arun B., Lu K., Bovin N.* // Molecular Immunology. 2009. V. 46. P. 3037–3049. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.06.010
4. *Shilova N., Huflejt M.E., Vuskovic M., Obukhova P., Navakouski M., Khasbiullina N., Pazynina G., Galanina O., Bazhenov A., Bovin N.* // Top. Curr. Chem. 2015. V. 366. P. 169–181. https://doi.org/10.1007/128_2013_469
5. *Vuskovic M., Xu H., Bovin N., Pass H., Huflejt M.* // Int. J. Bioinform. Res. Appl. 2011. V. 7. P. 402–426. https://doi.org/10.1504/IJBRA.2011.043771
6. *Jacob F., Goldstein D.R., Bovin N.V., Pochechueva T., Spengler M., Caduff R., Fink D., Vuskovic M.I., Huflejt M.E., Heinzelmann-Schwarz V.* // Int. J. Cancer. 2012. V. 130. P. 138–146. https://doi.org/10.1002/ijc.26002
7. *Butvilovskaya V.I., Popletaeva S.B., Chechetkin V.R., Zubtsova Z.I., Tsybulskaya M.V., Samokhina L.O., Vinnitskii L.I., Ragimov A.A., Pozharitskaya E.I., Grigoryeva G.A., Meshalkina N.Yu., Golysheva S.V., Shilova N.V., Bovin N.V., Zasedatelev A.S., Rubina A.Y.* // Cancer Medicine. 2016. V. 5. P. 1361–1372. https://doi.org/10.1002/cam4.692
8. *Зиганшина М.М., Шилова Н.В., Хасбиуллина Н.Р., Ракитько А.С., Тютюнник Н.В., Мантрова Д.А.,*

Тютюнник В.Л., Бовин Н.В., Сухих Г.Т. // Росс. аллергол. журн. 2018. V. 15. P. 37–39.

9. *Шилова Н.В., Хасбиуллина Н.Р., Полякова С.М., Ракитько А.С., Нокель А.Ю., Бовин Н.В.* // Росс. аллергол. журн. 2017. V. 14. P. 202–204.
10. *Vuskovic M., Barbuti A.-M., Goldsmith-Rooney E., Glassman L., Bovin N., Pass H., Tchou-Wong K.-M., Chen M., Yan B., Niu J., Qu Q., Costa M., Huflejt M.* // J. Proteom. Bioinform. 2013. V. 6. P. 302–312. https://doi.org/10.4172/jpb.1000295
11. *Efron B.* // Ann. Statist. 1969. V. 7. P. 1–26.
12. *Dobrochaeva K.L., Khasbiullina N.R., Shilova N.V., Knirel Yu.A., Bovin N.V.* // Mol. Imm. 2019. V. 106. P. 63–68. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.12.011
13. *Северов В.В., Пазынина Г.В., Овчинникова Т.В., Бовин Н.В.* // Биоорган. химия. 2015. Т. 41. С. 170–184. [*Severov V.V., Pazynina G.V., Ovchinnikova T.V., Bovin N.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. V. 41. P. 147–160.] https://doi.org/10.1134/S1068162015020120
14. *Северов В.В., Белянчиков И.М., Пазынина Г.В., Бовин Н.В.* // Биоорган. химия. 2007. Т. 33. С. 131–147. [*Severov V.V., Belyanchikov I.M., Pazynina G.V., Bovin N.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2007. V. 33. P. 122–138.] https://doi.org/10.1134/S1068162007010141
15. *Obukhova P., Korchagina E., Henry S., Bovin N.* // Transfusion. 2011. V. 52. P. 860–869. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03381.x
16. *Maerle A.V., Voronina D.V., Dobrochaeva K.L., Galanina O.E., Alekseev L.P., Bovin N.V., Zavriev S.K., Ryazantsev D.Yu.* // Glycoconj. J. 2017. V. 34. P. 199–205. https://doi.org/10.1007/s10719-016-9751-6
17. *Tupitsyn N.N., Udalova Y.A., Galanina O.E., Kadagidze Z.G., Borovkova N.B., Podolsky V.V., Shinkarev S.A., Gadetskaya N.A., Letyagin V.P., Obukhova P.S., Shilova N.V., Subbotina A.A., Bovin N.V.* // Hem. Imm. 2009. V. 2. P. 45–54.
18. *Miyake M., Kohno N., Nudelman E.D., Hakomori S.* // Cancer Res. 1989. V. 49. P. 5689–5695.
19. *Watanabe K., Hakomori S.* // J. Exp. Med. 1976. V. 744. P. 644–653.

Negative Correlation between Natural Human Antibodies Directed to Glycotopes Galβ1-3GlcNAc and Galβ1-4GlcNAc

N. V. Shilova*, **, *, I. M. Ryzhov*, M. M. Ziganshina**, A. S. Rakitko****, M. E. Huflejt*****, and N. V. Bovin*, #**

#Phone: +7 (495) 330-71-38; e-mail: professorbovin@yandex.ru

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

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

****Semiotik LLC, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117437 Russia*

*****Faculty of Mechanics and Mathematics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1A, Moscow, 119991 Russia*

******Faculty of Medical Science, University of Warmia and Mazury, ul. Warszawska 30, Olsztyn, 10-082 Poland*

In a cohort of 106 donors, we analyzed correlations in the binding of natural antibodies to human glycans in a composition of the glycan array. Along with trivial relationships (between structurally similar glycans), we found a high positive correlation between completely unrelated glycans. The most intriguing among the negative is the correlation of average strength (close to –0.5) between antibodies to Galβ1-3GlcNAc and antibodies to lactosamines $(Gal\beta1\text{-}4GlcNAc)_n$. The reason for the functional antagonism between these antibodies is not yet clear.

Keywords: natural antibodies, glycans, Le^c, polylactosamines, oncology, glycan array

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 753–760

УДК 579.222.3

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО HlyIIC-15 ПРОТИВ С-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА HlyII *B. cereus* ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С САЙТОМ УЗНАВАНИЯ ТРОМБИНОМ

© 2020 г. А. В. Замятина*, *, Н. В. Руденко*, #, А. П. Каратовская*, А. О. Шепеляковская*, А. В. Сиунов**, Ж. И. Андреева-Ковалевская**, А. С. Нагель**, В. И. Салямов**, А. С. Колесников**, Ф. А. Бровко*, ***, А. С. Солонин**, *****

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

***Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук", Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, РАН, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 5*

****Пущинский государственный естественно-научный институт, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 3*

Поступила в редакцию 29.04.2020 г.
После доработки 08.05.2020 г.
Принята к публикации 11.05.2020 г.

Среди панели моноклональных антител к рекомбинантному белку HlyIICTD *Bacillus cereus* обнаружено антитело, способное образовывать иммунный комплекс с областью узнавания тромбином, аминокислотная последовательность которой расположена внутри рекомбинантного HlyIICTD. Локализацию эпитопа проводили методами пептидного фагового дисплея, а также иммуноферментным анализом и иммуноблоттингом по взаимодействию с рекомбинантными белками, либо содержащими, либо не содержащими отдельные компоненты HlyIICTD. Выявленный эпитоп расположен в области тромбинового сайта и сохраняет способность взаимодействовать с антителом после протеолиотической атаки белка тромбином.

Ключевые слова: бактериальные порообразующие токсины, моноклональные антитела, эпитоп, фаговый дисплей, слитые рекомбинантные белки, Bacillus cereus sensu lato, тромбин

DOI: 10.31857/S013234232006038X

ВВЕДЕНИЕ

Производство различных рекомбинантных белков, отдельных субъединиц, а также полипептидов обусловливает развитие биотехнологических подходов, обеспечивающих быстрый и дешевый метод их выделения в нативном виде. В рутинных экспериментальных исследованиях часто используют различные аффинные сорбенты для жидкостной хроматографии, которые позволяют быстро и эффективно очищать рекомбинантные белки с последующим удалением необходимых для хроматографии этих белков "тэгов" специфическими протеазами. Одним из широко используемых вариантов является введение участков узнавания тромбином. Тромбин (фактор свертывания II) является компонентом системы свертывания крови млекопитающих и функционирует как сайт специфическая сериновая протеаза, нечувствительная к буферным растворам, содержащим различные детергенты [1]. Этот белок распознает сайт LVPR^GS и вносит разрыв между аргинином и глицином [2]. Для изучения генеза HlyII в бактериальных клетках и взаимодействия токсина с клетками эукариот создана панель МА к С-терминальному домену порообразующего белка HlyII [3]. Данная работа посвящена описанию HlyIIC-15, которое эффективно связывается с тромбиновым сайтом гибридного белка, но не с другими пептидными участками рекомбинантного CTD.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика аминокислотной последовательности HlyIICTD. Одним из факторов вирулентности условно-патогенного микроорганизма *B. cereus* является порообразующий токсин гемолизин II (HlyII) [4]. Гемолизин II со структурой типа β-баррель имеет высокую гомологию с альфа-токсином *S. aureus* и отличается от него наличием С-терминальной аминокислотной избыточности

Сокращения: HlyIICTD – С-терминальный домен гемолизина II *Bacillus cereus;* HlyII - гемолизин II *B. cereus,* МА – моноклональные антитела, PBS – фосфатно-солевой буфер.

Автор для связи: (тел. +7 (926) 592-11-89; эл. почта: nrudkova@mail.ru).

DNQKALEEQMNSINSVNDKLNKGKGKLSLSMNGNQLKATSSNAG
YGISYEDKNWGIFVNGEKVYTFNEKSTVGNISNDINKLNIKGPYIEI
KQIGT**LVPR**/**GS**MAISDPNSSSVDKLAAALE*HHHHHH*

Рис. 1. Аминокислотная последовательность HlyIICTD клонированная из HlyII *B. cereus* ATCC 14579 в pET29b. Молекулярная масса клонированного CTD, 13906.59 Da. Жирными буквами выделен тромбиновый сайт, / указывает место протеолитической атаки тромбином. Курсивом обозначен участок с шестью гистидинами.

из 94 остатков [5]. Этот участок при ЯМР-анализе продемонстрировал не описанную ранее уникальную пространственную структуру [6]. Участок гена клонирован и HlyIICTD очищен как описано в работе Руденко с соавторами [3]. Аминокислотная последовательность HlyIICTD состоит из аминокислотных остатков С-концевой избыточности HlyII, тромбинового сайта, шести остатков гистидина и линкера (рис. 1).

Особенности взаимодействия HlyIICTD с эритроцитами, выявляемые МА HlyIIC-15. В составе панели моноклональных антител против HlyIICTD обнаружено МА номер 15 (HlyIIC-15), которое не способно узнавать антиген в момент его взаимодействия с мембранами как эритроцитов [3], так и липосом [7]. Неспособность взаимодействия HlyIIC-15 со связавшимся с эритроцитами CTD, по-видимому, определяется стерическим расположением эпитопа для этого антитела и его недоступностью относительно точки узнавания мембраны антигеном.

В работе Miles с соавторами [8] было продемонстрировано, что нативный гемолизин II и делеционный вариант, лишенный С-концевого домена, эффективно олигомеризуется как в присутствии эритроцитов, так и липосом. В связи с этим проверена возможность олигомеризации CTD в присутствии эритроцитов и липосом. На рис. 2 показан иммуноблоттинг с использованием МА HlyIIC-15. Как видно из этого рисунка HlyIICTD в присутствии эритроцитов кролика и липосом переходит в тетрамерную форму. До добавления эритроцитов и липосом кроме мономерных форм HlyIICTD видны слабоокрашенные димерные и тетрамерные формы HlyIICTD (рис. 2, дорожка *2*). При инкубировании HlyIICTD с эритроцитами МА HlyIIC-15 выявляло тетрамерные формы, в то время как мономерные формы не видны (рис. 2, дорожка *3*). Аналогичные результаты были получены при инкубировании HlyIICTD с липосомами (рис. 2, дорожка *4*). Таким образом, HlyIIC-15 способно эффективно взаимодействовать с CTD, а эпитоп, узнаваемый этим антителом, расположен на поверхности и доступен МА HlyIIC-15 как у мономерных форм антигена, так и его тетрамерных форм.

Пептидный фаговый дисплей. Особенности взаимодействия HlyIICTD с эритроцитами, выявленные с помощью HlyIIC-15, поставили задачу определения эпитопа, узнаваемого этим антителом. Антигенную детерминанту HlyIICTD, узнаваемую МА HlyIIC-15, определяли методом пептидного фагового дисплея. В этом методе возможные пептидные варианты экспрессируется на поверхности фагового вириона. Отбор фагов, несущих пептидные аминокислотные последовательности, специфически взаимодействующие с МА HlyIIC-15, проводили по способности взаимодействовать друг с другом. Было проведено три раунда селекции. ДНК отобранных индивидуальных фаговых клонов секвенировали. С помощью программы GeneRuner проведен анализ полученных нуклеотидных последовательностей и определены аминокислотные последовательности пептидов, узнаваемых МА HlyIIC-15 и экспонированных в составе белка pIII бактериофагов.

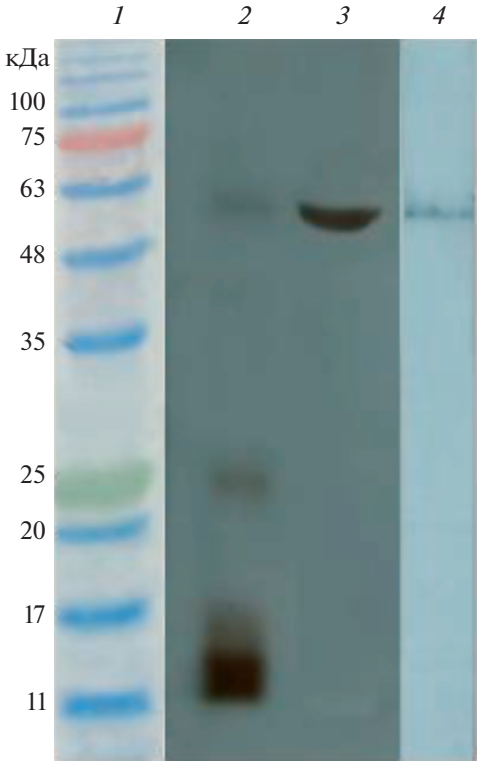


Рис. 2. Иммунноблоттинг HlyIICTD до (*2*) и после (*3*) инкубации с эритроцитами и с липосомами (*4*). Окрашено МА HlyIIC-15. (*1*) – маркеры молекулярных масс.

Таблица 1. Выравнивание участка аминокислотной последовательности HlyIICTD из HlyII *Bacillus cereus* и секвенированных пептидов

Номера клонов	Фрагмент HlyIICTD VGNISNDINKLNIKGPYIEIKQIGTLVPRGSMAISDPNSSSVDKLAAAL
1, 4, 5	----------LQVPRAQHHAIT---------
2	----------WSGALIPRNSTF----------
3	----------NNAPPPPLLFYH----------
6, 8	----------IPSFPNLIPRYA----------
7	----------IEPDVRGSLIPR----------
9	----------YLSTPSGSLVPR----------
10	----------SVQTLNLIPRQF----------
11, 12	----------HLLVPRFDVHSM----------

Таблица 2. Белки, использованные для иммуноблотинга

Белок	Рекомбинантная плазмида (вектор)	Источник гена	Ссылка/от кого получено
HlyII	pBD170-EH2	*B. cereus* B771	[19]
HlyIICTD	pET29b	*B. cereus* 14579^T	[3]
HlyII 6His	pSWEET-bgaB	*B. cereus* 14579^T	Лаб. молекулярной микробиологии ИБФМ РАН
HlyIIΔC	pET29b	*B. cereus* 14579^T	Лаб. молекулярной микробиологии ИБФМ РАН
PlcR	pET33b	*B. cereus* ATCC 4342^T	к.б.н. А.М. Шадрин
HlyIIR	pHR	*B. cereus* B771	[20]

После трех раундов аффинной селекции из неамплифицированного элюата последнего раунда отобраны 30 фаговых клонов. После анализа их взаимодействия с МА HlyIIC-15 отобрано 12 клонов, в которых определена последовательность экспонируемого фагом пептида. Аминокислотные последовательности всех пептидов были выравнены и обнаружено четыре консенсусных аминокислотных остатка (а.о.) LVPR. Причем в клонах 7 и 9 данная консенсусная последовательность непосредственно примыкает к глициновому линкеру, с помощью которого пептиды соединены с последовательностью структурного белка pIII бактериофага. Следовательно, протяженность участка узнавания МА HlyIIC-15 может включать либо четыре LVPR, либо пять а.о. – LVPRG. Остаток глицина является искусственно привнесенным в рекомбинантный белок пептидным фрагментом и выявленный пептид почти полностью соответствующим участку узнавания тромбина LVPR^GS.

Экспериментальное подтверждение локализации эпитопа, узнаваемого МА HlyIIC-15 методами иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга. С помощью иммуноферментного анализа сравнивали взаимодействие МА HlyIIC-15 со следующими препаратами: HlyIICTD, нативным делеционным вариантом HlyIIΔC (без С-терминального участка), содержащим тромбиновый сайт, а также с нативным препаратом HlyII, не содержащим тромбиновый сайт. HlyIIΔC и HlyIICTD, содержали шесть гистидиновых аминокислотных остатков. HlyII содержал интактный район, соответствующий С-концевой избыточности порообразующего токсина HlyII *B. cereus*. В результате иммуноферментного анализа показано, что при эффективном взаимодействии с HlyIICTD и HlyIIΔC, МА HlyIIC-15 не узнавали нативный HlyII, не содержащий тромбиновый сайт, что подтверждает результаты, полученные фаговым дисплеем о том, что эпитоп, узнаваемый HlyIIC-15 включает в себя сайт, узнаваемый тромбином.

Для подтверждения эпитопа узнаваемого HlyIIC-15 использовали иммуноблоттинг, в котором проверяли взаимодействие антител наряду с HlyIICTD с рекомбинатными белками PlcR [9], HlyII, делеционным вариантом HlyIIΔC и HlyIIR (репрессор гемолизина II) [10], а также нативным гемолизином II *B cereus* B771, клонированным в *Bacillus subtilus* BD170 (табл. 2). На рис. 3 продемонстрировано, что МА HlyIIC-15 способно образовывать иммунный комплекс с образцами, содержащими тромбиновый сайт и дополнительных шесть гистидиновых остатков, но не образует подобных комплексов с полноразмерным HlyII дикого типа, не содержащего ни тромбиновый сайт ни шесть гистидиновых аминокислотных остатков. Итак, для образования иммунного комплекса, исследуемого антитела с С-концевым участком HlyII

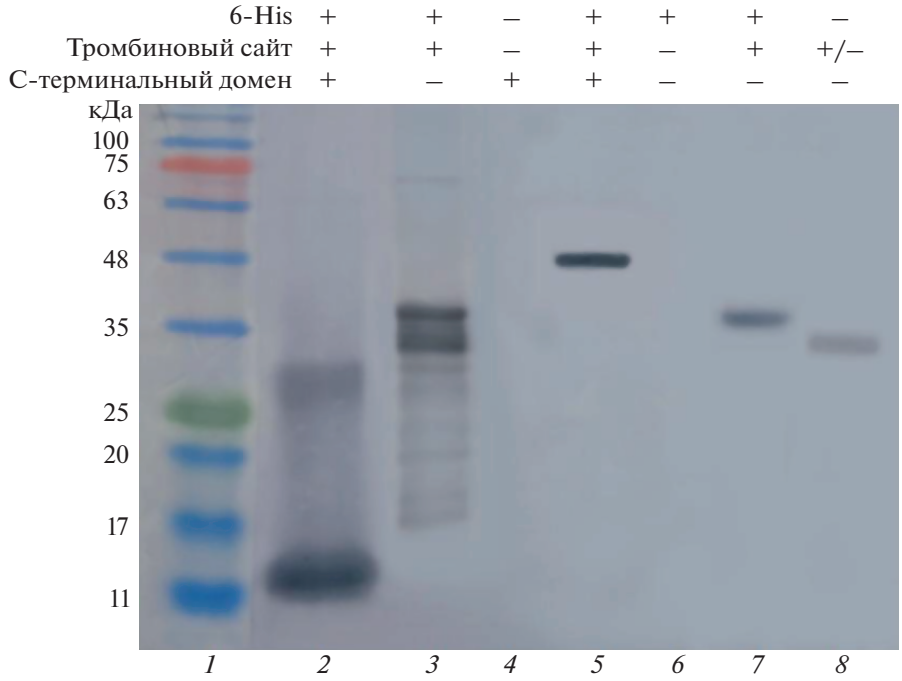


Рис. 3. Иммуноблоттинг с использованием HlyIIC-15. *1* – белки молекулярной массы, *2* – CTD, *3* – HlyIIΔC, *4* – Гемолизин II *B. cereus* B771, клонированный в *Bacilus subtilis, 5* – HlyII6His, *6* – HlyIIR, *7* – PlcR, *8* – PlcR, обработанный тромбином.

в рекомбинантном белке, необходимо присутствие дополнительных районов, включающих шесть гистидиновых остатков, пептидный линкер и сайт, узнаваемый тромбином. Это предположение было подтверждено способностью МА HlyIIC-15 узнавать рекомбинантный транскрипционный регулятор PlcR *B. cereus*, содержащий тромбиновый сайт, линкер и шестигистидиновый участок в N-концевой части этого белка. Дополнительным доказательством узнавания МА HlyIIC-15 района, расположенного за пределами С-концевого домена HlyII, является способность образовывать иммунный комплекс рекомбинантного белка, лишенного CTD, но содержащего тромбиновый сайт, линкер и шестигистидиновый участок в С-концевой части этого белка. В связи с тем, что HlyIIR, содержащий шесть гистидиновых остатков в N-концевой части, не способен образовывать иммунный комплекс с МА HlyIIC-15 можно заключить, что для узнавания МА своего антигена необходима область тромбинового сайта.

Рекомбинантные белки, содержащие тромбиновый сайт (HlyIICTD и PlcR) были обработаны тромбином. После чего электрофоретическая подвижность белков изменялась в сторону уменьшения молекулярного веса. Интенсивность окрашивания PlcR МА HlyIIC-15 также уменьшалась, что может свидетельствовать о снижении степени связывания антитела с антигеном при удалении части аминокислотных остатков, входящих в эпитоп. Анализ возможности взаимодействия рекомбинантных белков, содержащих тромбиновый сайт, линкер и шестигистидиновый участок на разных концах рекомбинантных белков после обработки тромбином позволил подтвердить, что район узнавания МА HlyIIC-15 расположен в области тромбинового сайта. Как видно из рисунка PlcR, содержащий тромбиновый сайт с линкером и шестью гистидиновыми остатками на N-конце, после обработки тромбином снижает, но сохраняет способность окрашиваться HlyIIC-15, это позволило заключить, что МА HlyIIC-15 способно узнавать более широкий участок, чем определено фаговым дисплеем. Аналогичный результат получен после обработки тромбином HlyIICTD. По-видимому, ключевыми аминокислотными остатками эпитопа являются составляющие сайта узнавания тромбином и плюс, возможно, часть из района окружения этого сайта (рис. 4). После протеолиза тромбином рекомбинантного HlyIICTD, содержащего тромбиновый сайт с линкером и шестью гистидиновыми остатками на С-конце белок взаимодействовал с МА HlyIIC-15, что может однозначно указывать на узнавание этим антителом как минимум четырех аминокислотных оснований LVPR, входящих в состав тромбинового сайта (данные не приведены).

Таким образом, район расположения экспериментально детектируемого эпитопа подтверждает определение этого эпитопа пептидным фаговым

C-рекомбинантный белок-gt**lvpr**/**gs**mainsd**p**nsssvdklaaaleHHHHHH

N-mgssHHHHHHss**lvpr**/**gs**hmasr-рекомбинантный белок

Рис. 4. Сравнение участков аминокислотных последовательностей при их различной локализации: C-концевая локализация тромбинового сайта и N-концевая локализация тромбинового сайта. Жирными буквами обозначен сайт узнавания тромбином. / –указывает место протеолитической атаки тромбином. Заглавными буквами обозначен участок, содержащий шесть гистидиновых остатков.

дисплеем. Четырех аминокислот LVPR достаточно для узнавания МА HlyIIC-15.

ОБСУЖДЕНИЕ

В течение долгого времени очистка и получение высокоочищенных белков было довольно затратным как по времени, так и затратам, особенно это касалось белков, взаимодействующих с мембранами. Применение современных генно-инженерных технологий частично решило эту проблему. Для получения рекомбинантных белков созданы многочисленные экспрессионные системы с промоторами, обеспечивающими высокий уровень транскрипции гибридных генов в различных бактериальных и грибных системах. В связи с тем, что вопрос как о потенциальной токсичности химических индукторов экспрессии, так и токсичности конечных искомых продуктов до сих пор остается открытым, широко используются ранее описанные варианты инициации биосинтеза, посредством индуктора или температурного сдвига. В этом случае последовательность целевого гена помещается под контроль эффективных фаговых промоторов [11–13]. Для повышения растворимости, уровня экспрессии, а также эффективной очистки аффинной хроматографией к N- или C-концам рекомбинантных белков присоединяют короткие маркерные аминокислотные последовательности, получившие название “fusion tags” [14]. Получение рекомбинантного белка в растворимой форме иногда удается решить присоединением вспомогательной последовательности – хорошо растворимого белка-партнера [15]. Однако, как в первом, так и во втором случае конечный продукт отягощен дополнительными белковыми участками и не является нативным продуктом. На передний план выходит цель в производстве различных рекомбинантных белков, отдельных субъединиц, а также полипептидов, восстановление конечных продуктов в нативном виде. Эта цель достигается введением дополнительных пептидных районов, узнаваемых высоко специфическими протеазами, которые способны отщеплять используемые тэги и восстанавливать рекомбинантные белки практически до нативного состояния. Создание технологии получения рекомбинантных белков или пептидов с использованием протеолитического расщепления всегда является задачей, требующей индивидуального решения для каждого продукта. Одной из часто используемых высокоспецифичных протеаз является тромбин. После фермент-зависимого протеолиза тромбин может быть легко удален посредством жидкостной хроматографии, предназначенной для очистки или удаления сериновых протеаз. Однако использование тромбина ограничивается лабораторными исследованиями [16]. Наиболее существенным недостатком протеазы является способ ее получения из плазмы крови млекопитающих.

Таким образом, в данной работе описано МА HlyIIC-15, выявляющее тромбиновый сайт за пределами структурной части клонированного белка, содержащего этот сайт. Результаты данной работы предполагают расширение возможностей использования тромбина и сайта его узнавания не только для отсечения дополнительных пептидных участков, но и в качестве маркера для идентификации и отслеживания различных рекомбинантных белков.

Учитывая, что тромбин активирует факторы свертывания крови V, VIII, VII, XI, XIII, протеин C, тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза [17], то есть они имеют в своем составе пептидные участки, узнаваемые этим белком, МА HlyIIC-15, связывающееся с участком разрезания тромбином, можно использовать для массового анализа образцов при исследовании различных патологий системы свертывания крови. Медицинская практика последних месяцев показала, что при инфекции COVID-19 у пациентов в тяжелой форме наблюдается образование странных тромбов в крови [18]. У ряда больных отмечались признаки сгущения крови и образования тромбов в разных органах. Нейрохирурги отмечают резкий всплеск инсультов из-за тромбов, а патологоанатомы наблюдали при вскрытии легкие, наполненные сотнями микротромбов. В связи с этим использование МА HlyII-15, может оказаться удачным инструментом в изучении и понимании процессов свертывания крови в ходе инфекции COVID-19.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы плазмиды и белки. *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, Германия) была использована для трансформации pET29b(+) (Novagen, Германия), *E. coli* ER2738 для афинной селекции фагов.

Среды и растворы. Среды: 2YT (16 г/л бактотриптон, 1 г/л дрожжевой экстракт, 5 г/л NaCl, pH 7.0), 1.5% агар и 0.7% агар на основе 2YT. Растворы: 1000× IPTG/X-gal 1.25 г IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) и 1 г X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) в 25 мл DMF (dimethyl formamide), тетрациклин 20 мг/мл в 50% этаноле, фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), PBST–PBS, содержащий 0.1% Tween-20, блокирующий раствор 1% желатин на основе PBS-T, преципитирующий раствор PEG/NaCl (20% (w/v) полиэтиленгликоль-6000, 2.5 M NaCl). Белковые маркеры (Abcam, Англия) и ДНК электрофорезные маркеры (Fermentas, Литва), конъюгат антител козла с пероксидазой хрена (Thermo Scientific, США), конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (Thermo Scientific, США).

Фаговая пептидная библиотека. В работе для определения эпитопа на молекуле HlyIICTD использовали библиотеку случайных пептидов из 12 аминокислотных остатков (New England Biolabs), отображаемых на фаге M13KE [21]. 12-Мерная фаговая пептидная библиотека имеет репертуар 10^9, пептиды экспонированы на поверхности бактериофагов в составе минорного белка pIII. Каждый клон в библиотеке представлен ~1000 копий.

Аффинная селекция бактериофагов, специфически взаимодействующих с МА HlyIIC-15, проводилась в соответствии с инструкцией к фаговой библиотеке с некоторыми модификациями. Для проведения всех трех раундов селекции МА HlyIIC-15 сорбировали на планшеты для иммуноферментного анализа (Greiner, high binding, США) из концентрации 10 мкг/мл в объеме 100 мкл в Na-карбонатном буфере pH 9.6, в течение ночи, при 4°C. Для каждого раунда использовали по 8 лунок. Для предотвращения возможной неспецифической сорбции иммунопланшеты инкубировали с блокирующим буфером в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее к экспериментальным лункам добавляли по 10 мкл фаговой библиотеки с концентрацией частиц 3.8×10^{12} частиц/мл. Инкубировали в течение ночи при 4°C. После инкубации с фаговыми частицами иммунопланшеты отмывали не менее 10 раз PBST. Элюцию связавшихся фагов проводили добавлением в лунки 100 мкл суспензии клеток *E. coli* (штамм ER2738), находящихся в экспоненциальной фазе роста (OD_{600} ~ 0.5) с последующей инкубацией при 37°C в течение 45 минут, на этом этапе происходило инфицирование клеток бактериофагами. Далее *E. coli* собирали из лунок и переносили в колбы с 20 мл среды 2YT, содержащей 20 мкг/мл тетрациклина и культивировали в течение ночи на качалке при 200 об./мин и 37°C для амплификации элюированных бактериофагов. Параллельно с этим определяли количество элюированных бактериофагов методом выращивания в полужидком агаре. После третьего раунда элюат не амплифицировали. Для изоляции отдельных фагов его титровали на чувствительной культуре и переносили индивидуальные негативные колонии фаговых клонов в пробирки с 5 мл среды 2YT, содержащей разведенную 1 : 100 ночную культуру ER2738. Проводили раздельную амплификацию фаговых клонов в течение ночи на термошейкере при 37°C.

Фаговые клоны, взаимодействующие с МА HlyIIC-15 наилучшим образом, были выбраны по результатам твердофазного иммуноферментного анализа их взаимодействия с сорбированными МА HlyIIC-15. Взаимодействие выявляли с помощью кроличьих поликлональных антител против M13 и антител козла против иммуноглобулинов кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена. Бактериофаги этих клонов были использованы для выделения и секвенирования ДНК.

Выращивание бактериофагов в полужидком агаре. 5 мл среды 2YT с тетрациклином инокулировали 50 мкл ночной культуры *E. coli* (штамм ER2738) и культивировали при 37°C до плотности суспензии, соответствующей OD_{600} ~ 0.5. Готовили чашки Петри с агаризованной средой (1.5% агар на основе 2YT) с IPTG/X-gal и тетрациклином. Полужидкий агар расплавляли на водяной бане и разливали по 3 мл в стерильные культуральные пробирки, поддерживая температуру 45°C. К 3 мл полужидкого агара добавляли 20 мкл суспензии *E. coli* в экспоненциальной фазе роста и 50 мкл препарата, содержащего бактериофаги (на этапе проведения раундов селекции – инфицированные клетки). В случае необходимости предварительно делали серийные разведения препаратов бактериофагов. Полученную смесь быстро выливали и распределяли поверх агаризованной среды. Чашки инкубировали в течение ночи при 37°C, после чего подсчитывали количество негативных колоний фаговых клонов – бляшек.

Выделение ДНК бактериофагов. Ночную культуру *E. coli* зараженных индивидуальными клонами бактериофагов центрифугировали 10 минут при $5000 \times g$, 4°C. Бактериофаги выделяли из супернатанта путем осаждения полиэтиленгликолем MW 6000 в присутствии высокой концентрации NaCl [21]. Концентрацию фаговых частиц в супернатанте определяли спектрофотометрически при длине волны 269 нм и рассчитывали по формуле [ф.ч.] = $(2 \times 10^{14} \times A_{269})/30$. Одноцепочечную ДНК индивидуальных клонов выделяли методом фенольной экстракции с последующим осаждением этиловым спиртом [22].

Секвенирование ДНК. Анализ последовательностей ДНК потомков фаговых клонов для определения последовательностей встроек проводили в компании Евроген. Обработка результатов секвенирования производилась в программах Gene Runner, ClustalW.

Наработка липосом. Липосомы готовили из раствора лецитина в концентрации 1 мг/мл в смеси хлороформа и метанола (молярное отношение, 2 : 1). После сушки под вакуумом, липидную пленку ресуспендировали в буфере (10 мМ Трис-HCl, pH 7.2, 100 мМ KCl) до общей концентрации липидов 1 мг/мл. Липосомы получали обработкой ультразвуком в течение 30 мин на льду [4]. Олигомерные формы HlyIICTD выявляли после электрофоретического разделения смеси HlyIICTD (9 мкМ) с липосомами, предварительно инкубированными в течение 1 часа, при 37°C, и переноса на нитроцеллюлозную мембрану с последующим окрашиванием МА HlyIIC-15.

Иммуноблоттинг. Электрофоретическое разделение белков в исследуемых препаратах проводили в присутствии β-меркаптоэтанола как в работе [23]. Перенос на нитроцеллюлозную мембрану проводили в течение 15 ч при силе тока 20 мА в буфере, содержащем 25 мМ Трис-HCl, 0.25 М глицин, 0.1% додецилсульфат натрия, 20% метанол, pH 8.3. Центры неспецифической сорбции блокировали добавлением 1% (w/v) раствора желатина в PBST в течение 30 мин. Далее мембраны инкубировали в течение 2 ч с МА HlyIIC-15 (10 мкг/мл). После инкубации с антителами мембраны обрабатывали 1 ч конъюгатом пероксидазы хрена с кроличьими антителами к иммуноглобулинам мыши в разведении согласно рекомендации производителя (Thermo Scientific, США) в PBST. На каждой стадии нитроцеллюлозные мембраны тщательно отмывали PBST. Мембрану окрашивали раствором, содержащим 3 мМ диаминобензидина-3,3 тетрагидрохлорида (Sigma-Aldrich, США) и 0.03% перекиси водорода.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.б.н. А. М. Шадрину за предоставленные препараты PlcR из *B. cereus*.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-00592.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Andrew M., Paes B., Milner R., Johnston M., Mitchell L., Tollefsen D.M., Powers P.* // Blood. 1987. V. 70. P. 165–172.
2. *Vergis J.M., Wiener M.C.* // Protein Expr Purif. 2011. V. 78. P. 139–142. https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.04.011
3. *Руденко Н.В., Каратовская А.П., Замятина А.В., Сиунов А.В., Андреева-Ковалевская Ж.И., Нагель А.С., Бровко Ф.А., Солонин А.С.* // Биоорган. химия. 2020. Т. 46. С. 280–285. [*Rudenko N.V., Karatovskaya A.P., Zamyatina A.V., Siunov A.V., Andreeva-Kovalevskaya Zh.I., Nagel A.S., Brovko F.A., Solonin A.S.* // Rus. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 321–326.] https://doi.org/10.1134/S1068162020030188
4. *Andreeva Z.I., Nesterenko V.F., Fomkina M.G., Ternovsky V.I., Suzina N.E., Bakulina A.Y., Solonin A.S., Sineva E.V.* // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1768. P. 253–263. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.11.004
5. *Baida G., Budarina Z. I., Kuzmin N.P., Solonin A.S.* // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 180. P. 7–14.
6. *Kaplan A.R., Kaus K., De S., Olson R., Alexandrescu A.T.* // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 3277. https://doi.org/10.1038/s41598-017-02917-4
7. *Замятина А.В., Руденко Н.В., Каратовская А.П., Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Бровко Ф.А., Солонин А.С.* // Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов. 2019. С. 95–97.
8. *Miles G., Bayley H., Cheley S.* // Protein Sci. 2002. V. 11. P. 1813–1824.
9. *Huillet E., Bridoux L., Barboza I., Lemy C., André-Leroux G., Lereclus D.* // Microbiology. 2020. V. 166. P. 398–410. https://doi.org/10.1099/mic.0.000883
10. *Kovalevskiy O.V., Lebedev A.A., Surin A.K., Solonin A.S., Antson A.A.* // J. Mol. Biol. 2007. V. 365. P. 825–834.
11. *Солонин А.С., Таняшин В.И., Баев А.С.* Новые плазмидные вектора, содержащие регуляторный район фага лямбда // Докл. Акад. наук. СССР. 1979. Т. 245. С. 722–725.
12. *Kosykh V.G., Solonin A.S., Buryanov Ya.I., Bayev A.A.* // Biochim. Biophys. Acta. 1981. V. 655. P. 102–106.
13. *Soriano E., Borth N., Katinger H., Mattanovich D.* // Biotechnol. Bioeng. 2002. V. 80. P. 93–99.
14. *Terpe K.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 60. P. 523–533.
15. *Baubichon-Cortay H., Baggetto L.G., Dayan G., Di Pietro A.* // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 22983–22989.
16. *Hemker H.C., Al Dieri R., De Smedt E., Béguin S.* // Thromb Haemost. 2006. V. 96. P. 553–561.
17. *Tang N., Li D., Wang X., Sun Z.J.* // Thromb Haemost. 2020. V. 18. P. 844–847. https://doi.org/10.1111/jth.1476832073213
18. *Han H., Yang L., Liu R., Liu F., Wu K.L., Li J., Liu X.H., Zhu C.L.* // Clin. Chem. Lab. Med. 2020. pii: /j/cclm.ahead-of-print/cclm-2020-0188/cclm-2020-0188.xml. https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0188

19. *Sineva E.V., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Shadrin A.M., Gerasimov Y.L., Ternovsky V.I., Teplova V.V., Yurkova T.V., Solonin A.S.* // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 299. P. 110–119. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01742.x
20. *Budarina Z.I., Nikitin D.V., Zenkin N., Zakharova M., Semenova E., Shlyapnikov M.G., Rodikova E.A., Masyukova S., Ogarkov O., Baida G.E., Solonin A.S., Severinov K.A.* // Microbiology. 2004. V. 150 (Pt 11). P. 3691–3701.
21. *Reddy P., McKenney K.* // Biotechniques. 1996. V. 20. P. 854–860.
22. Ph.D.™ Phage Display Libraries. Instruction Manual. Version 3.0 11/18. New England Biolabs, Inc.
23. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

HlyIIC 15 Monoclonal Antibody against the C-Terminal Domain of *B. cereus* HlyII Interacts with the Thrombin Recognition Site

A. V. Zamyatina*, *, N. V. Rudenko*, #, A. P. Karatovskaya*, A. O. Shepelyakovskaya*, A. V. Siunov**, Zh. I. Andreeva-Kovalevskaya**, A. S. Nagel**, V. I. Salyamov**, A. S. Kolesnikov**, F. A. Brovko *, ***, and A. S. Solonin**, *****

#Phone: +7 (926) 592-11-89; e-mail: nrudkova@mail.ru

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

***Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, FSBIS FRC Pushchino Scientific Centre of Biological Research, Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 5, Pushchino, Moscow, 142290 Russia*

****Pushchino State Institute of Natural Sciences, pr. Nauki 3, Pushchino, Moscow, 142290 Russia*

Testing a panel of monoclonal antibodies to the recombinant HlyIICTD protein from *Bacillus cereus* revealed an antibody capable to form an immune complex with a thrombin recognition region the amino acid sequence of which is located within the recombinant HlyIICTD. The epitope was localized by peptide phage display methods, as well as enzyme immunoassay and immunoblotting for interaction with recombinant proteins that either contain or do not contain individual HlyIICTD components. The detected epitope is located in the cleavage region of the thrombin site and retains the ability to interact with the antibody after thrombin proteolytic attack of a protein with trombin cleavage site.

Keywords: bacterial pore-forming toxins, monoclonal antibodies, epitope, phage display, fused recombinant proteins, Bacillus cereus sensu lato, thrombin

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 761–769

УДК 57.083.3

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АЛЛЕРГЕНОВ Phl p 1 И Amb a 1 ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА Е

© 2020 г. О. О. Михеева*, #, М. А. Костромина*, Д. Д. Лыкошин*, М. Н. Терешин*, С. К. Завриев*, Е. В. Свирщевская*, С. В. Хлгатян, Р. С. Есипов*, #**

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

***ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5*

Поступила в редакцию 07.04.2020 г.
После доработки 18.04.2020 г.
Принята к публикации 24.04.2020 г.

В клетках *E. coli* экспрессированы основные рекомбинантные аллергены Phl p 1 тимофеевки луговой (*Phleum pratense*) и Amb a 1 амброзии полынолистной (*Ambrosia artemisiifolia*) и разработаны методики их очистки с использованием анионообменной и аффинной хроматографий, которые позволяют получать 10 мг Phl p 1 и 7.5 мг Amb a 1 с литра культуральной среды с электрофоретической чистотой не менее 90%. Для анализа способности IgE антител связывать Phl p 1 и Amb a 1 использовали сыворотки людей с IgE к различным аллергенам, идентифицированных методом RIDA. Часть сывороток связывала Phl p 1 или Amb a 1, что подтвердило иммунореактивность полученных рекомбинантных белков. Титры антител к Amb a 1 коррелировали с данными RIDA по чувствительности к смеси трав и пыльце ржи. Титры антител к Phl p 1 не коррелировали с данными RIDA. Из отобранных 20 положительных сывороток 73 и 89% сывороток, распознающих Phl p 1 или Amb a 1 соответственно, имели антитела к кроссреактивной группе аллергенов ольха/береза/лещина.

Ключевые слова: аллергия, рекомбинантные аллергены, иммуноглобулины класса Е

DOI: 10.31857/S0132342320060196

ВВЕДЕНИЕ

Различными формами аллергических заболеваний I типа, опосредованных антителами Е класса (IgE), страдает 20–30% населения развитых стран [1]. Аллергическую реакцию могут вызывать самые разнообразные белки, которые содержатся в пыльце растений, домашней пыли, плесневых грибах, пищевых продуктах и т.д. Для формирования аллергии необходимыми и достаточными условиями являются: генетическая предрасположенность; размер сенсибилизирующего агента и наличие в его составе значительного белкового компонента. Поскольку в развитых странах доля людей, страдающих аллергией, устойчиво держится на уровне 20–30% населения и понемногу растет, аллергию следует отнести не столько к болезни, сколько к одному из типов нормального функционирования иммунной системы. Ранее наличие патогенных и условнопатогенных инфекций приводило к переключению иммунной системы на борьбу с инвазией патогенов. В современном стерильном и вакцинированном против основных патогенов мире иммунная система распознает все чужеродное, что попадает на барьерные ткани тела: кожу, бронхолегочную систему (БЛС) и в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ). Аллергическая реакция I типа, манифестирующаяся синтезом IgE, начинается в детском возрасте в ответ на пищевые белки, а в дальнейшем присоединяется респираторная форма или атопический дерматит.

Пыльца трав, вследствие интенсивного и длительного высвобождения, является одним из наиболее важных переносимых по воздуху источников аллергенов во всем мире [2, 11].

В России одними из основных аллергенов, вызывающих аллергические реакции, являются пыльца березы (*Betula pendula*) [22], а также тимофеевка луговая и амброзия полынолистная.

Тимофеевка луговая распространена в Европе и соседних регионах Африки и Азии. Она широко культивируется в большинстве регионов мира с умеренным климатом на пастбищах и для производства сена, поэтому аллергия на пыльцу этого растения является глобальной проблемой [3].

Аллергены пыльцы злаков группы 1 гомологичны, присутствуют во всех видах пыльцы се-

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-68-33; эл. почта: esipov@ibch.ru; olga.mikheeva.92@mail.ru).

Таблица 1. Содержание белка Phl p 1 в штаммах-продуцентах относительно общего белка клетки. (Данные получены при использовании программы Image Lab (версия 5.2.1), Bio-Rad, США)

Штамм-носитель, *E. coli*	Условия культивирования	Содержание белка, %	Объем клеточной биомассы, г/л
KRX	23°C, 4 часа	27	3.8
	23°C, 18 часов	26.4	4.0
	37°C, 4 часа	31.1	4.0
	37°C, 18 часов	28.6	4.2
C3030	23°C, 4 часа	27.6	3.6
	23°C, 18 часов	27.5	4.1
	37°C, 4 часа	33.2	3.9
	37°C, 18 часов	31.3	4.1
ER2566	23°C, 4 часа	30.3	4.0
	23°C, 18 часов	29.8	4.2
	37°C, 4 часа	30.7	4.2
	37°C, 18 часов	30.6	4.4
Bl21(DE3)pLys	23°C, 4 часа	29.7	3.8
	23°C, 18 часов	29.2	4.1
	37°C, 4 часа	**32.0**	**4.4**
	37°C, 18 часов	29.5	4.6

мейства злаковых и могут перекрестно разпознаваться IgE антителами из сывороток больных. Один из наиболее характерных аллергенов группы 1 из пыльцы тимофеевки является Phl p 1 [12]. Его эпитопы имеют гомологию с эпитопами аллергенов группы 1 других растений, и соответственно, наблюдается перекрестная реактивность к большинству других аллергенов группы 1 [4]. Несколько клинических исследований продемонстрировали высокую аллергенную активность и клиническую значимость Phl p 1 [13, 14], так как он является основным аллергеном, а сенсибилизация к нему обычно предшествует сенсибилизации к другим компонентам пыльцы злаков [5], в связи с чем его можно использовать в качестве диагностического маркера для выявления пациентов с аллергией на пыльцу этого вида трав [15]. Phl p 1 относится к классу бета-экспансинов – белков клеточной стенки, играющих важную роль в проникновении пыльцевой трубки в семязачаток.

На сегодняшний день второй по частоте причиной респираторной аллергии после пыльцы трав являются аллергены из пыльцы амброзии [16]. Родиной растений рода амброзия является Северная Америка, откуда они были занесены в Европу. Быстрому распространению этого растения способствуют атмосферные циклоны, которые переносят пыльцу амброзии на большие расстояния [6], что, в свою очередь, приводит к сенсибилизации до 80% населения определенных регионов [17]. Основным аллергеном пыльцы амброзии является Amb a 1, чувствительность к которому у пациентов составляет до 90% [18, 19]. Amb a 1 – это негликозилированный белок массой 38 кДа, принадлежащий к семейству пектат-лиазных белков, который составляет до 15% от общего количества белков в пыльце амброзии [20, 21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантного белка Phl p 1

Ген, кодирующий пыльцевой аллерген из *Phleum pratense* получен методом обратной транскрипции на матрице мРНК, выделенной из пыльцы тимофеевки луговой и клонирован в плазмидный вектор pET23a+ для прокариотической экспрессии в *E. coli*.

Эффективность экспрессии рекомбинантного гена оценивали при культивировании разных штаммов *E. coli* при температурах 23 и 37°C в течение 4 и 18 часов после индукции биосинтеза белка. В целом белок эффективно нарабатывался во всех штаммах-носителях *E. coli*. Несколько большее содержание (32%) и съем биомассы (4.4 г/л) достигался при культивировании штамма-продуцента *E. coli* BL21 (DE3)pLys/pER-Phlp1 (табл. 1).

Белок Phl p 1 в ходе культивирования агрегировал с образованием тел включений (рис. 1). После разрушения клеточной биомассы проводили отмывку тел включения от нуклеиновых кислот и липидной фракции [23]. Для солюбилизации целевого белка из тел включений подбирали концентрации мочевины – установлено, что белок

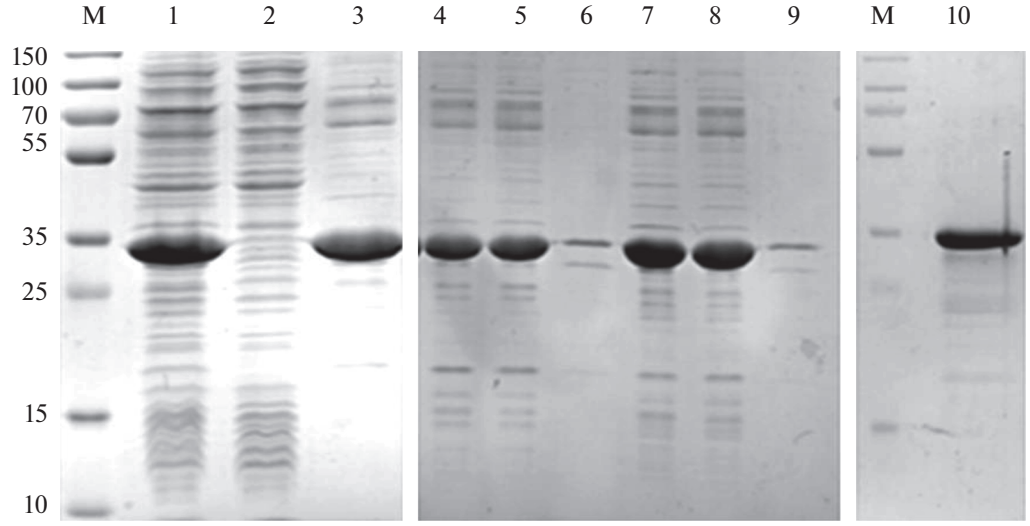


Рис. 1. Получение и очистка белка Phl p 1. M – маркер молекулярных масс, 1 – тотальный клеточный лизат, 2 – осветленный клеточный лизат, 3 – осадок тел включений, 4, 7 – тотальный клеточный лизат при 4 и 8 М мочевине соответственно; 5, 8 – осветленный клеточный лизат при 4 и 8 М мочевине соответственно; 6, 9 – клеточный осадок при 4 и 8 М мочевине соответственно, 10 – Phl p 1 после гель-фильтрационной хроматографии.

Phl p 1 экстрагируется при использовании буферного раствора, содержащего 4 М мочевину (рис. 1).

Для очистки Phl p 1 от клеточных белков на первом этапе использовали металл-хелатную аффинную хроматографию в присутствии 4 М мочевины в градиенте имидазола. При разработке методики выделения было установлено, что Phl p 1 склонен к образованию олигомерных форм [2, 8]. Для предотвращения олигомеризации дальнейшие стадии ионообменной и гель-фильтрационной хроматографий проводили на фоне 5 мМ ДТТ.

Полученный белок Phl p 1 охарактеризован с использованием электрофореза в SDS-ПААГ (рис. 1). По данным электрофоретического анализа, чистота препарата составила не менее 95%.

Получение рекомбинантного белка Amb a 1

Ген, кодирующий пыльцевой аллерген из *Ambrosia artemisiifolia*, получен методом обратной транскрипции на матрице мРНК, выделенной из пыльцы амброзии полынолистной и клонирован в плазмидный вектор pET23a+ для прокариотической экспрессии в *E. coli*.

При анализе последовательности гена Amb a 1 с помощью Codon Usage Database, было обнаружено, что в гене содержится 3% редко встречаемого для экспрессии в *E. coli* кодона AGG, кодирующего аргинин. Поэтому для экспрессии гена Amb a 1 использовали штамм *E. coli* Rosetta (DE3), предназначенный для экспрессии генов с редкими для *E. coli* кодонами (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC и GGA).

В ходе подбора условий культивирования штамма – носителя для экспрессии гена Amb a 1 было исследовано влияние температуры (23 и 37°C) и времени индукции белкового биосинтеза (4 и 18 часов). Содержание целевого белка относительно общего клеточного белка за 4 часа составил 11.8% при 37°C (табл. 2).

При культивировании штамма-продуцента *E. coli* Rosetta (DE3)/pER-Amba1 белок агрегировал с образованием тел включений (рис. 2). После разрушения клеточной биомассы проводили отмывку тел включения от нуклеиновых кислот и липидной фракции. Для солюбилизации целевого белка из клеточного осадка подбирали концентрации мочевины. Было установлено, что белок Amb a 1 экстрагируется при использовании буферного раствора, содержащего 8 М мочевину (рис. 2).

На первой стадии очистки Amb a 1 проводили анионообменную хроматографию в буферных растворах, содержащих 8 М мочевину. Фракции с

Таблица 2. Содержание белка Amb a 1 в штамме-продуценте *E. coli* Rosetta (DE3)/pER-Amba1 относительно общего белка клетки. (Данные получены при использовании программы Image Lab (версия 5.2.1), Bio-Rad, США)

Условия культивирования	Содержание белка, %	Объем клеточной биомассы, г/л
23°C, 4 часа	–	2.2
23°C, 18 часов	5	2.6
37°C, 4 часа	**11.8**	**3.1**
37°C, 18 часов	10.3	2.9

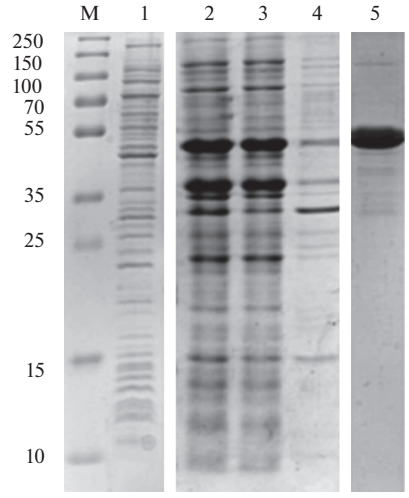


Рис. 2. Получение и очистка белка Amb a 1. M – маркер молекулярных масс. 1 – клеточный лизат до индукции белкового биосинтеза, 2 – тотальный клеточный лизат через 4 часа после индукции белкового биосинтеза при 37°C, 3 – осветленный клеточный лизат при 8 M мочевине, 4 – клеточный осадок после лизирования в 8 M мочевине, 5 – белок после гель-фильтрационной хроматографии.

чистотой более 70% объединяли и проводили ренатурацию белкового раствора. После ренатурации последовательно осуществляли металл-аффинную и гель-фильтрационную хроматографии.

Полученный Amb a 1 охарактеризован с использованием электрофореза в SDS-ПААГ (рис. 2). По данным электрофоретического анализа, чистота препарата составила не менее 95%.

Иммуноферментный анализ сывороток против рекомбинантных аллергенов Phl p 1 и Amb a 1

Способность IgE распознавать полученные рекомбинантные белки Phl p 1 и Amb a 1 анализировали с помощью метода непрямого твердофазного ИФА. Для анализа использовали набор сывороток людей с диагностированной респираторной аллергией на различные типы аллергенов, входящие в состав пыльцевой панели № 2 RIDA (R-Biopharm AG, Германия). В состав панели № 2 входит 20 аллергенов: клещи домашней пыли *D. pseronisinus*, *D. farinae*, ольха, береза, лещина, дуб, смесь трав (рожь посевная, тимофеевка луговая, овсяница луговая, райграс высокий, колосок душистый, костер безостый, пырей ползучий, ежа сборная, плевел, лисохвост луговой, бухарник шерстистый, свинорой пальчатый), рожь (пыльца), полынь, подорожник, кошка, лошадь, собака, морская свинка, хомяк, кролик, грибы penicillum, cladosporium, aspergillus и alternaria. Антигены тимофеевки луговой входят только в смесь трав, а аллергенов амброзии в составе панели нет. Для анализа отбирали произвольные сыворотки, содержащие IgE к любому из аллергенов панели. Из 132 протестированных сывороток в анализе Phl p 1 29 сывороток (21%) показали достоверное связывание (рис. 3*а*). Из 84 сывороток в анализе Amb a 1 положительными оказались 11 сывороток (13%) (рис. 3*б*). Все образцы сывороток были получены от жителей Москвы и Московской области. Различие частоты сенсибилизации к тимофеевке и амброзии показывает, что в центральном регионе амброзия распространена меньше, чем на юге России.

Можно предположить, что распознавание Phl p 1 в ИФА и смеси трав из набора № 2 RIDA, в который входит экстракт тимофеевки, будет коррелировать. Для анализа корреляции использовали данные RIDA и ИФА. На рис. 4 приведен спектр сенсибилизации к респираторным аллергенам панели № 2 RIDA сывороток, связывающихся с Phl p 1 (рис. 4*а*) и Amb a 1 (рис. 4*б*). Общая картина сенсибилизации на респираторные аллергены в группе больных с IgE антителами к антигенам тимофеевки и амброзии отличалась. Сыворотки, специфично распознающие Phl p 1, высокоспецифичны к груп-

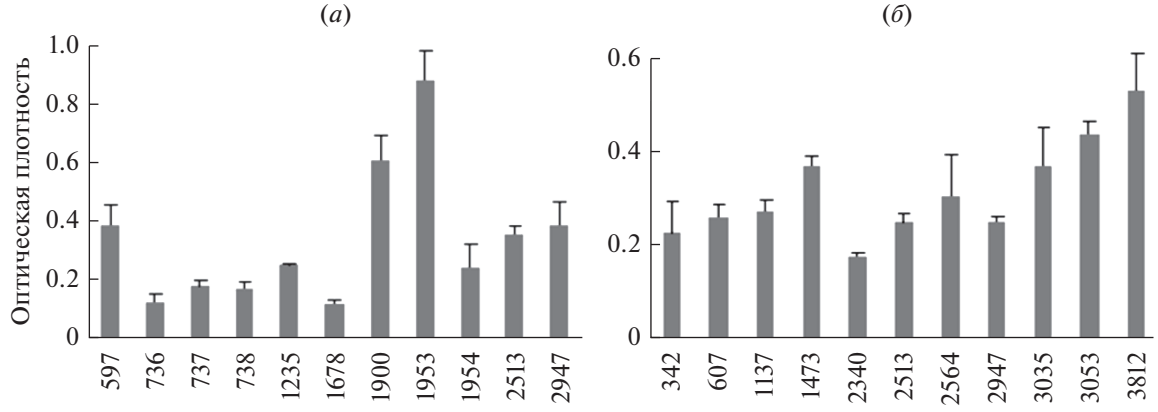


Рис. 3. Распознавание IgE антителами из сывороток больных с респираторной аллергией рекомбинантных белков Phl p1 (*а*) и Amb a 1 (*б*). Номерами отмечены различные сыворотки. Сыворотка 2947 распознавала оба аллергена.

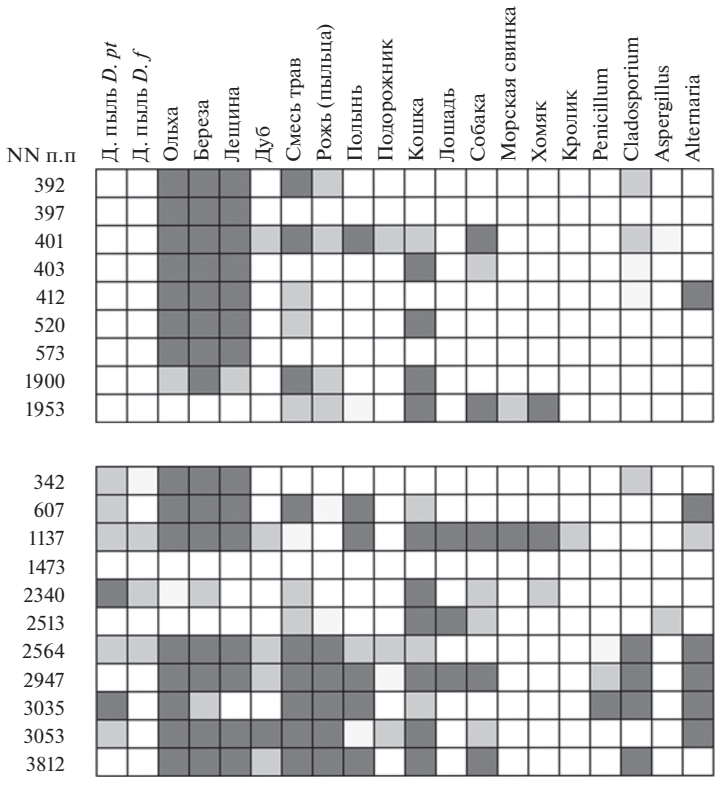


Рис. 4. Распознавание респираторных аллергенов IgE антителами из сывороток, специфичных к Phl p 1 (*а*) или Amb a 1 (*б*). Класс титров IgE к различным аллергенам показан по увеличению от светлого до темного фона, где белый цвет соответствует отсутствию IgE антител, светло-серый соответствует умеренному распознаванию (классы 2–3); темно-серый соответствует значительному распознаванию (классы 4–6).

пе гомологичных аллергенов – ольха, береза, лещина. В группе Amb a 1 сыворотки распознавали не только отмеченную триаду, но и многие другие пыльцевые аллергены, а также грибные (рис. 4).

Анализ корреляции распознавания Phl p 1 не выявил связи данных ИФА с распознаванием других респираторных аллергенов в системе RIDA (табл. 3). Распознавание Amb a 1 достоверно ($p < 0.05$) коррелировало с распознаванием сорных трав и пыльцы ржи (табл. 3).

Таким образом, очевидно, что белок Amb a 1 является иммуногенным и может быть использован как в диагностических целях, так и для аллерген-специфической иммунотерапии. Распознавание рекомбинантного белка Phl p 1 не коррелировало с распознаванием смеси трав, в состав которых входит экстракт тимофеевки. Это может означать как малое количество аллергенов тимофеевки в составе экстракта, так и неспецифическое распознавание Phl p 1. Известно, что распознавание конформационных эпитопов некоторых белков аллергенов опосредовано связыванием IgE с сахарами белков, например, как это было показано для белков Der f 1 и Der p 1 из клещей домашней пыли. С другой стороны, имеются тест-системы на основе Phl p 1, например, компания HELIX (Москва, Россия) (https://helix.ru/kb/item/21-679), что демонстрирует возможность использования негликозилированного белка Phl p 1 для диагностики. Дополнительным свидетельством достаточной иммуногенности Phl p 1 является значительная связь с чувствительностью 8 из 9 сывороток (89%) к триаде гомологичных аллергенов – береза, ольха и лещина (рис. 4). Отсутствие корреляции дан-

Таблица 3. Коэффициенты корреляции Пирсона данных панели № 2 RIDA и ИФА на белках Phl p1 и Amb a 1

	Ольха	Береза	Лещина	Дуб	Смесь трав	Рожь	Полынь
Phl p 1	0.222	0.160	0.214	–	–0.100	–0.116	0.453
Amb a 1	0.286	0.087	0.301	0.429	**0.679***	**0.784***	0.329

* Достоверность $p < 0.5$, прочерк соответствует недостаточному количеству данных для обсчета. Данные получены по сравнению титров IgE, полученных методом ИФА, с данными денситометрии, полученными методом RIDA.

ных RIDA и ИФА для этих белков может быть связано с лимитированным диапазоном полуколичественного распознавания белков тестом RIDA. В дальнейшем планируется проведение параллельного анализа чувствительных к Phl p 1 сывороток методами ИФА и immunoCAP для возможного использования полученного белка в качестве иммуномаркера и создания тест-системы для диагностики аллергии на пыльцу трав.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

При создании экспрессионного вектора использовали: набор для выделения суммарной РНК ExtractRNA, набор для синтеза кДНК Mint, набор для выделения и очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Standart, набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep, Encyclo-полимеразу – Евроген (Россия), рестриктазы NdeI и XhoI (Thermo Scientific, США), pET23a+ (EMD Millipore, США). Использовали бактериальные штаммы *E. coli* Bl21 (DE3) pLys и Rosetta (DE3). При культивировании использовали бакто-триптон, бакто-агар и дрожжевой экстракт (Becton Dickinson, США). При выделении белка использовали следующие реактивы производства Panreac (США): Трис(гидроксиметил)-аминометан гидрохлорид (Трис-HCl), дигидрофосфат натрия, хлорид натрия, имидазол, динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA); PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (Thermo Scientific, США).

Получение экспрессионных плазмидных векторов, содержащих гены Phl p 1 и Amb a 1

Из образцов пыльцы *Phleum pretense* и *Ambrosia artemisiifolia* с использованием реактива для выделения суммарной РНК ExtractRNA (Евроген, Россия) была выделена мРНК, на матрице которой была получена кДНК с помощью ревертазы Mint (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Для амплификации генов, кодирующих аллергены Phl p 1 и Amb a 1 были использованы олигонуклеотидные праймеры Phl-forward GGTGGTCATATGATCCCCAAGGTTCCCCCGGGTC и Phl-reverse GGTGGTCTCGAGCTTGGACTCGTAGGCGGTGTCGGC; Amb-forward GGTGGTCATATGGCCGAAGATCTCCAGGAAATC и Amb-reverse GGTGGTCTCGAGGCAAGGTGCTCCAGGAG, содержащие сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции NdeI и XhoI, соответственно (подчеркнуты) (Thermo Scientific, США). Олигонуклеотидные праймеры были подобраны на основании последовательности мРНК генов, кодирующих Phl p 1 и Amb a 1 (номера в GenBank CQ789447 и M80558.1, соответственно). Для ПЦР использовали Encyclo-полимеразу (Евроген, Россия). Полученные ампликоны были обработаны эндонуклеазами рестрикции NdeI и XhoI и клонированы в плазмидный вектор pET23a+, предварительно обработанный этими же рестриктазами. В результате были получены рекомбинантные экспрессионные вектора pER-Phlp1 и pER-Amba1. Правильность нуклеотидных последовательностей клонированных генов была подтверждена их секвенированием (Евроген, Россия).

Подбор штаммов E. coli для экспрессии генов аллергенов Phl p 1 и Amb a 1

В качестве штаммов-носителей для созданного вектора pER-Phlp1 использовали штаммы *E. coli* BL21 (DE3) pLys, KRX, C3030 и ER2566, а для вектора pER-Amba1 – Rosetta (DE3). Трансформированные клетки высевали на среду LB (1% бактотриптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl) с агаром, содержащих 100 мкг/мл ампициллина для клеток ER2566, BL21 (DE3) pLys и KRX и 100 мкг/мл ампициллина и 20 мкг/мл хлорамфеникола для клеток Rosetta (DE3) и C3030, и выращивали в течение 14 ч при 37°C для получения отдельных колоний. После чего несколько колоний переносили в 100 мл среды LB с 20% глюкозой и 100 мкг/мл ампициллина и выращивали 16 ч при 37°C на шейкере CERTOMAT® S II (Sartorius, Германия) при перемешивании со скоростью 180 об./мин для получения ночной культуры с OD_{600} 3.5. Полученной ночной культурой штаммов-продуцентов *E. coli* BL21 (DE3)pLys/pER-Phlp1, KRX/pER-Phlp1, ER2566/pER-Phlp1, Rosetta (DE3)/pER-Amba1 засевали среду LB с 0.2% глюкозой и 100 мкг/мл ампициллина, культурой C3030/pER-Phlp1 засевали среду SOB с 0.2% глюкозой и 100 мкг/мл ампициллина в культуральных колбах Эрленмейера (процент засева составлял 2%) и выращивали при 37°C при перемешивании со скоростью 160 об./мин. При поглощении клеточной культуры OD_{600} 0.8 вносили IPTG до концентрации 0.4 мМ, в случае культуры клеток штамма-продуцента KRX/pER-Phlp1вносили IPTG до концентрации 0.4 мМ и рамнозы до 0.2% и выращивали при 23 и 37°C в течение 4 и 18 часов. Клеточную биомассу получали центрифугированием в течение 20 мин при 4°C и 4000 об./мин на центрифуге Avanti J-30I (Beckman Coulter, Германия).

Выделение аллергена Phl p I

4 г клеточной биомассы штамма-продуцента *E. coli* BL21 (DE3) pLys/pER-Phlp1 ресуспендировали в буферном растворе 50 мМ Трис-HCl, pH 8.5 с 1 мМ PMSF в соотношении 1 : 10 (w/v) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Labsonic P (Sartorius, Германия) в течение 20 мин при 4 °C (цикл – 0.5 с, амплитуда – 50%). Затем центрифугировали при 12000 об./мин в течение 30 мин при 4°C на центрифуге Hermle Z383K

(HERMLE Labortechnik GmbH, Германия). Для очистки от нуклеиновых кислот и липидов полученный осадок тел включения последовательно отмывали (ресуспендировали в соотношении 1 : 10 (w/v), перемешивали 30 мин, центрифугировали) в двух буферных растворах: № 1 – 50 мМ Трис-HCl, pH 8.5 (буфер А) с 0.1% тритоном X-100; № 2 – буфер А. После чего осадок, полученный при дезинтеграции штамма-продуцента BL21 (DE3) pLys/pER-Phlp1 ресуспендировали в буферном растворе А с 4 М мочевиной в соотношении 1 : 20 (w/v) и перемешивали до полного растворения в течение 1 часа. После центрифугирования белковый раствор разбавляли в 2 раза раствором А с 4 М мочевиной и наносили на колонку XK 26/40 (GE Healthcare, США), содержащую 30 мл сорбента Ni^{2+}-IDA (Qiagen, Германия), предварительно уравновешенную буферным раствором А с 4 М мочевиной. Отмывку от балластных белков проводили буферным раствором А с 4 М мочевиной. Целевой белок элюировали линейным градиентом буферного раствора А с 4 М мочевиной и 500 мМ имидазолом.

После металл-хелатной хроматографии в элюат добавляли ДТТ до 5 мМ и наносили на колонку XK 16/20 (GE Healthcare, США), содержащую 15 мл сорбента Q HP (GE Healthcare, США), уравновешенного буферным раствором А с 5 мМ ДТТ. Элюцию целевого белка проводили линейным градиентом буферного раствора А с добавлением 5 мМ ДТТ и 1 М NaCl.

Элюат после ионообменной хроматографии концентрировали при помощи ультрафильтрационной ячейки Amicon 8200 объемом 200 мл (Millipore, США) на мембране RC 10 кДа (Millipore) до конечной концентрации 2 мг/мл. Последующую очистку проводили на колонке HiLoad 16/60 с сорбентом Superdex 75 (GE Healthcare) в буферном растворе А с 100 мМ NaCl, 10% глицерина и 5 мМ ДТТ. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и концентрировали с помощью ультрафильтрации до конечной концентрации 2 мг/мл, как описано ранее.

Выделение аллергена Amb a 1

4 г клеточной биомассы штамма-продуцента *E. coli* Rosetta/pER-Amba1 ресуспендировали в буферном растворе 50 мМ Трис-HCl, pH 8.5 с 1 мМ PMSF в соотношении 1 : 10 (w/v) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Labsonic P (Sartorius, Германия) в течение 20 мин при 4°C (цикл – 0.5 с, амплитуда – 50%). Затем центрифугировали при 12000 об./мин в течение 30 мин при 4°C на центрифуге Hermle Z383K (HERMLE Labortechnik GmbH, Германия). Для очистки от нуклеиновых кислот и липидов полученный осадок тел включения последовательно отмывали (ресуспендировали в соотношении 1 : 10 (w/v); перемешивали 30 мин; центрифугировали) в двух буферных растворах: № 1 – 50 мМ Трис-HCl, pH 8.5 (буфер А) с 0.1% тритоном X-100; № 2 – буфер А. После чего осадок, полученный при дезинтеграции штамма-продуцента Rosetta (DE3)/pER-Amba1 ресуспендировали в буферном растворе А с 8 М мочевиной в соотношении 1 : 20 (w/v) и перемешивали до полного растворения в течение 1 часа. После центрифугирования белковый раствор разбавляли в 2 раза раствором А с 8 М мочевиной и наносили на колонку XK 16/20 (GE Healthcare, США), содержащую 15 мл сорбента Q HP (GE Healthcare, США), уравновешенного буферным раствором А с 8 М мочевиной. Элюцию целевого белка проводили линейным градиентом буферного раствора А с добавлением 8 М мочевины и 1 М NaCl. Затем в элюат после анионообменной хроматографии добавляли ДТТ до 5 мМ и перемешивали в течение 1 часа, после чего разбавляли в 20 раз буферным раствором А и инкубировали при перемешивании в течение 14 часов при 10°C. После чего белковый раствор наносили на колонку XK 26/40 (GE Healthcare, США), содержащую 30 мл сорбента Ni^{2+}-IDA (Qiagen, Германия), предварительно уравновешенную буферным раствором А. Отмывку от балластных белков проводили буферным раствором А. Целевой белок элюировали линейным градиентом буферного раствора А с 500 мМ имидазолом.

Элюат после металл-аффинной хроматографии концентрировали при помощи ультрафильтрационной ячейки Amicon 8200 объемом 200 мл (Millipore, США) на мембране PES 10 кДа (Millipore) до конечной концентрации 5 мг/мл. Последующую очистку проводили на колонке HiLoad 16/60 с сорбентом Superdex 75 (GE Healthcare) в буферном растворе А с 100 мМ NaCl, 10% глицерина. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и концентрировали с помощью ультрафильтрации до конечной концентрации 2 мг/мл, как описано ранее.

Аналитические методы

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда, используя БСА в качестве стандарта [9]. Чистоту белка определяли с помощью ДСН–ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях [10].

Получение биотинилированных антител

Моноклональные антитела к человеческому IgE (Сорбент, Москва) были конъюгированы с производным биотина сульфосукнимидил-6-(биотинамидо)гексаноатом, взятом в 10-кратном молярном избытке. Реакцию проводили в течение 1 часа при комнатной температуре. От избытка непрореагировавшего биотина избавлялись с помощью диализа в течение 18 часов при 4°C.

Сыворотки крови больных с аллергией

Сыворотки получены из КПО ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова (Москва, Россия) с информированного добровольного согласия участников и собраны за период с 2009 по 2017 гг. Пациенты проходили первичную аллергодиагностику с использованием коммерческих наборов RIDA (Германия). Всего использовали 132 сыворотки больных с аллергией на Phl p 1 и 84 сыворотки для Amb a 1.

Проведение непрямого иммуноферментного анализа (ИФА)

Для проведения ИФА на 96-луночный планшет (Linbro, Germany) наносили 50 мкл раствора белка Phl p 1 или Amb a 1 (5 мкг/мл) в качестве подложки и оставляли на ночь при 4°C. Затем производили трехкратную отмывку фосфатным буфером (ФБ) (137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4, 1.76 мМ KH_2PO_4, pH 7.4, 0.05% Tween-20), после чего на планшет наносили 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ФБ. Далее в лунки добавляли разведенные сыворотки больных и оставляли инкубироваться на 2 ч при комнатной температуре. После этого вновь проводили трехкратную отмывку. Вносили 50 мкл раствора первичного конъюгата биотинилированных антител к IgE (титр 1 : 1000) и оставляли инкубироваться на 2 час. Производили двукратную отмывку и добавили по 50 мкл раствора стрептавидина в ФБ в соотношении 1 : 10000, инкубировали 30 мин. После инкубации отмывали планшет 3 раза, затем добавляли 50 мкл 3,3'5,5'-тетраметилбензидина. Реакцию останавливали через 10–15 мин, добавляя в лунки планшета по 50 мкл 10% раствора серной кислоты. Оптическую плотность образцов определяли на планшетном спектрофотометре Titertek (UK) при длине волны 450 нм.

Статистический анализ

Результаты обрабатывали при использовании пакета Microsoft Excel и параметрическим корреляционным анализом по Пирсону. Подсчитывали двусторонний *t*-критерий Стьюдента и параметрический двусторонний коэффициент корреляции по Пирсону. Статистически значимой считали уровень достоверности $p < 0.05$.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследованием с участием животных в качестве объектов исследований.

Участники давали добровольное согласие на получение сывороток в КПО ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (Москва, Россия).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Haahtela T., Holgate S., Pawankar R., Akdis C.A., Benjaponpitak S., Caraballo L., Demain J., Portnoy J., Hertzen von L.* // World Allergy Organization. 2013. P. 1–13. https://doi.org/10.1186/1939-4551-6-3
2. *Andersson K., Lidholm J.* // Int. Arch. Allergy Immunol. 2003. V. 130. P. 87–107. https://doi.org/10.1159/000069013
3. *Bousquet P.-J., Chinn S., Janson C., Kogevinas M., Burney P., Jarvis D.* // Allergy. 2007. V. 62. P. 301–309. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01293.x
4. *Focke M., Mahler V., Ball T., Sperr W.R., Majlesi Y., Valent P., Kraft D., Valenta R.* // FASEB J. 2001. V. 15. P. 2042–2044. https://doi.org/10.1096/fj.01-0016fje
5. *Hatzler L., Panetta V., Lau S., Wagner P., Bergmann R.L., Illi S., Bergmann K.E., Keil T., Hofmaier S., Rohrbach A., Bauer C.P., Hoffman U., Forster J., Zepp F., Schuster A., Wahn U., Matricardi P.M.* // J. Allergy Clin. Immunol. 2012. V. 130. P. 894–901. e5. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.053
6. *Storkey J., Stratonovitch P., Chapman D.S., Vidotto F., Semenov M.A.* // PLoS One. 2014. V. 9. P. e88156. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088156
7. *Smith M., Cecchi L., Skjøth C.A., Karrer G., Šikoparija B.* // Environ. Int. 2013. V. 61. P. 115–126. https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.08.005
8. *Suck R., Kamionka T., Schäffer B., Wahl R., Nandy A., Weber B., Petersen A., Birner-Grünberger R., Siva Charan D.V., Keller W., Fiebig H., Cromwell O.* // Biochimica et Biophysica Acta. 2006. V. 1764. P. 1701–1709. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.09.015
9. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.J.* // Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
10. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
11. *Suphioglu C., Singh M.B., Taylor P., Bellomo R., Holmes P., Puy R., Knox R.B.* // Lancet. 1992. V. 339. P. 569–572. https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)90864-y
12. *Laffer S., Valenta R., Vrtala S., Susani M., Van Ree R., Kraft D., Scheiner O., Duchêne M.* // J. Allergy Clin. Immunol. 1994. V. 94. P. 689–698. https://doi.org/10.1016/0091-6749(94)90176-7
13. *Westritschnig K., Horak F., Swoboda I., Balic N., Spitzauer S., Kundi M., Fiebig H., Suck R., Cromwell O., Valenta R.* // Eur. J. Clin. Invest. 2008. V. 38. P. 260–267. https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2008.01938.x
14. *Niederberger V., Stübner P., Spitzauer S., Kraft D., Valenta R., Ehrenberger K., Horak F.* // J. Invest. Dermatol. 2001. V. 117. P. 848–851. https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01470.x
15. *Bokanovic D., Aberer W., Hemmer W., Heinemann A., Komericki P., Scheffel J., Sturm G.J.* // Allergy. 2013. V. 68. P. 1403–1409. https://doi.org/10.1111/all.12263
16. *Asero R.* // Allergy. 2007. V. 62. P. 1097–1099. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01436.x

17. *Oswalt M.L., Marshall G.D.* // Allergy Asthma Clin. Immunol. 2008. V. 4. P. 130–135. https://doi.org/10.1186/1710-1492-4-3-130
18. *King T.P., Norman P.S., Tao N.* // Immunochemistry. 1974. V. 11. P. 83–92. https://doi.org/10.1016/0019-2791(74)90321-8
19. *Gadermaier G., Wopfner N., Wallner M., Egger M., Didierlaurent A., Regl G., Aberger F., Lang R., Ferreira F., Hawranek T.* // Allergy. 2008. V. 63. P. 1543–1549. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2008.01780.x
20. *Bordas-Le Floch V., Groeme R., Chabre H., Baron-Bodo V., Nony E., Mascarell L., Moingeon P.* // Allergy Asthma Rep. 2015. V. 15. P. 63. https://doi.org/10.1007/s11882-015-0565-6
21. *Rafnar T., Griffith I.J., Kuo M.C., Bond J.F., Rogers B.L., Klapper D.G.* // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 1229–1236.
22. *Симонова М.А., Пивоваров В.Д., Рязанцев Д.Ю., Костромина М.А., Муравьева Т.И., Мокроносова М.А., Хлгатьян С.В., Есипов Р.С., Завриев С.К.* // Биоорган. химия. 2018. Т. 44. С. 203–211. [*Simonova M.A., Pivovarov V.D., Ryazantsev D.Yu., Kostromina M.A., Muravieva T.I., Mokronosova M.A., Khlgatian S.V., Esipov R.S., Zavriev S.K.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 217–224.] https://doi.org/10.7868/S0132342318020124
23. *Романов В.П., Костромина Т.И., Мирошников А.И., Феофанов С.А.* // Биоорган. химия. 2016. Т. 42. С. 697–703. [*Romanov V.P., Kostromina T.I., Miroshnikov A.I., Feofanov S.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2016. V. 42. P. 631–637.] https://doi.org/10.1134/S1068162016040154

Production of Recombinant Allergens Phl p 1 and Amb a 1 for Detection of Class E Immunoglobulins

O. O. Mikheeva*,#, M. A. Kostromina*, D. D. Lykoshin[a], M. N. Tereshin*, S. K. Zavriev*, E. V. Svirshchevskaya*, S. V. Khlgatyan, and R. S. Esipov*,#**

#Phone +7(495) 336-68-33; e-mail: esipov@ibch.ru; olga.mikheeva.92@mail.ru

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

***Mechnikov's Institute of Vaccines and Sera, Maly Kazenny pereulok 5, Moscow, 105064 Russia*

Recombinant major allergens Phl p 1 from meadow timothy (*Phleum pratense*) and Amb a 1 from ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) were obtained in *E. coli* cells. Allergen purification procedures have been developed using anion exchange and affinity chromatography, which allows to obtain 10 mg Phl p 1 and 7.5 mg Amb a 1 from a liter of culture medium with an electrophoretic purity of at least 90%. To analyze the ability of IgE antibodies to bind Phl p 1 and Amb a 1, sera obtained from people with IgE to various respiratory allergens, identified by the RIDA method, were used. Part of the sera bound Phl p 1 or Amb a 1, which confirmed the immunoreactivity of the obtained recombinant proteins. Antibody titers to Amb a 1 correlated with RIDA data on sensitivity to a mixture of herbs and rye pollen. Antibody titers to Phl p 1 did not correlate with RIDA data. Of the 20 positive sera selected, 73 and 89% of the sera recognizing Phl p 1 or Amb a 1, respectively, had antibodies to the cross-reactive alder/birch/hazel allergen group.

Keywords: allergy, *recombinant allergens*, *immunoglobulin E*

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 770–783

УДК 577.344

УВЕЛИЧЕНИЕ ЯРКОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ СВЕРХФОТОСТАБИЛЬНОГО МУТАНТА EGFP ПУТЕМ ВНЕСЕНИЯ МУТАЦИЙ, БЛОКИРУЮЩИХ ПРОТОНИРОВАНИЕ ХРОМОФОРА

© 2020 г. А. В. Мамонтова*, А. М. Шахов, А. П. Григорьев***, К. А. Лукьянов****, А. М. Богданов****, #**

**Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Россия, 121205 Москва, Большой бульвар, 30, с. 1*

***Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Косыгина, 4, корп. 1*

****ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1*

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

Поступила в редакцию 21.04.2020 г.
После доработки 26.04.2020 г.
Принята к публикации 30.04.2020 г.

Дизайн флуоресцентных белков с увеличенной фотостабильностью – важная практическая задача. Один из подходов к ее решению связан с поиском аминокислотных остатков, играющих ключевую роль в фотохимических реакциях с участием хромофора. Ранее было продемонстрировано влияние тирозина-145 на фотоокисление хромофора зеленого флуоресцентного белка EGFP (enhanced green fluorescent protein, улучшенный зеленый флуоресцентный белок), а также получен мутант EGFP-Y145L, в котором эффективность фотоокисления и связанного с ним фотообесцвечивания существенно снижены. В настоящей работе мы ищем пути увеличения яркости флуоресценции этого мутантного варианта, вводя в него замены S205V и E222G и их комбинацию с целью сдвига pH-равновесия хромофорного окружения в сторону ионизации хромофора. Мы показали, что оба варианта белка с заменой S205V несут в основном нейтральный хромофор, имеют низкую яркость и способны к медленной фотоактивации. Они могут представлять интерес для изучения светозависимого переноса протона и, возможно, функционировать в качестве времяразрешенных pH-сенсоров. В белке EGFP-Y145L/E222G, как мы и ожидали, хромофор пребывает преимущественно в анионной форме. Этот мутантный вариант характеризуется яркостью флуоресценции, в 4 раза превосходящей таковую у исходного EGFP-Y145L и фотостабильностью в 1.5–5 раз выше, чем у EGFP.

Ключевые слова: флуоресцентные белки, GFP, фотостабильность, флуоресцентная спектроскопия, светоиндуцированное окисление, хромофор, время жизни возбужденного состояния, ESPT

DOI: 10.31857/S0132342320060184

ВВЕДЕНИЕ

Белки семейства GFP – единственный класс кодируемых одним геном флуоресцентных красителей – занимают особое место среди маркеров, применяющихся в биомедицинской науке. Совместимость этих меток с большинством экспрессионных систем, самодостаточность формирования хромофорной группы, их стабильность и сравнительно невысокая токсичность обеспечили бурное развитие методов прижизненного мечения биологических объектов с помощью флуоресцентных белков (известное как “GFP-революция” [1]). За открытие GFP и его внедрение в научную практику была присуждена Нобелевская премия по химии [2].

Модификация кодирующей последовательности ДНК – основной способ получения новых вариантов флуоресцентных белков (ФБ). Так, уже в первые годы после клонирования гена *avGFP* из медузы *Aequorea victoria* и успешной демонстрации его экспрессии в гетерологичных биологиче-

Сокращения: GFP – green fluorescent protein; зеленый флуоресцентный белок; avGFP – *Aequorea victoria* green fluorescent protein; зеленый флуоресцентный белок из медузы *Aequorea victoria*; ФБ – флуоресцентные белки; ESPT – excited state proton transfer; перенос протона в возбужденном состоянии; EC – extinction coefficient; коэффициент экстинкции; EGFP – enhanced green fluorescent protein; улучшенный зеленый флуоресцентный белок; YFP – yellow fluorescent protein, желтый флуоресцентный белок; FLIM – fluorescence lifetime imaging microscopy, микроскопия времени жизни флуоресценции; QY – quantum yield; квантовый выход флуоресценции; PBS – phosphate buffered saline; фосфатно-солевой буферный раствор; SMLM – single molecule localization microscopy; микроскопия локализации одиночных молекул; PAGFP – photoactivatable GFP; фотоактивируемый GFP.

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

ских системах [3] были получены мутанты с улучшенной яркостью [4–6] и сдвигами эмиссии флуоресценции в синюю [7] и красную [8] области спектра. Внесение всего одной аминокислотной замены (T203H) позволило создать первый фотоактивируемый вариант GFP [9]. Позже, после клонирования генов красных флуоресцентных белков из морских кораллов [10], мутагенез помог решить проблему спонтанной олигомеризации этих молекул [11, 12]. Богатая палитра флуоресцентных белков, доступных исследователям на сегодняшний день [13], в основном наполнена вариантами, разработанными искусственно [14, 15].

Дизайн ФБ, особенно на ранних этапах "GFP-революции", был нацелен на улучшение их базовых практических характеристик – увеличение яркости флуоресценции и скорости созревания хромофора, а также на расширение спектрального разнообразия этих флуорофоров, важного для развития методов многоцветного мечения [16, 17]. Успешное решение этих задач обеспечивалось, в частности, сравнительно простыми алгоритмами скрининга и селекции мутантов с искомыми свойствами в бактериальной системе экспрессии [7, 12]. Упомянутый выше мутант avGFP с увеличенной яркостью – EGFP (enhanced green fluorescent protein), описанный спустя всего год после демонстрации экспрессии *avGFP* в *E. coli* и *C. elegans*, был получен путем внесения двух аминокислотных замен в родительский белок. Примечательно, что EGFP по сей день остается одним из наиболее востребованных зеленых ФБ, несмотря на постепенное появление вариантов с оптимизированным фолдингом, более быстрым созреванием и существенно возросшей яркостью [18–20]. Таким образом, характеристики EGFP как метки для традиционной флуоресцентной микроскопии оказались адекватными запросам исследователей. Сложные экспериментальные модели и современные методы флуоресцентной визуализации заставили обратить внимание на свойства ФБ, прежде считавшиеся второстепенными, – фототоксичность, способность к фотопереключениям, фотостабильность, время жизни флуоресценции. Оказалось, что дизайн новых вариантов ФБ с настройкой таких характеристик – трудоемкая задача, хотя бы потому, что наладить массовый скрининг и отбор мутантов здесь сложно, а подчас и невозможно.

Одним из специфических требований, предъявляемых к флуорофорам в микроскопии сверхвысокого разрешения (семейство методов SMLM [21, 22]) и времяразрешенной микроскопии (FLIM [23]), выступает фотостабильность, т.е. способность молекулы поддерживать многократные циклы поглощения/испускания света [24]. Если в классической флуоресцентной микроскопии она влияет в основном на длительность эксперимента (как функцию удельной нагрузки возбуждающего излучения на образец), то в SMLM и FLIM, где регистрируются отдельные фотоны, фотостабильность определяет качество экспериментальных данных, связанное с числом фотонов, в среднем излучаемым отдельными молекулами маркера [25, 26]. Фотостабильность тесно связана с обесцвечиванием хромофора ФБ вследствие протекания фотохимических процессов с его участием. Изучение молекулярных механизмов фотообесцвечивания служит основной для разработки новых подходов к увеличению фотостабильности. В литературе описано получение фотостабильных вариантов ФБ с помощью направленной белковой эволюции [7, 27, 28], а также с помощью рационального дизайна, базирующегося на исследовании фотообесцвечивания. Так, в мутантах красных ФБ mKate2 S143C (назван mStable) и mPlum S146C фотостабильность примерно на порядок величины выше, чем в родительских белках, за счет стабилизации хромофора в цис-конформации сульфоксидными группами, образующимися при фотоокислении введенного в белок остатка цистеина [29]. Для фотопереключаемых белков семейства EosFP фотоокисление серосодержащего остатка было, наоборот, предложено как потенциальный канал исчерпания возможностей переключений (т.н. фотоусталости). Действительно, при введении замены Met159Ala фотостабильность IrisFP (гомолога EosFP) значительно увеличилась [30]. Наконец, в нашей работе, посвященной поиску аминокислотных остатков EGFP, опосредующих фотоокисление его хромофора, была выявлена ключевая роль Tyr145 как промежуточного электронного акцептора и описан мутант EGFP-Y145L, демонстрирующий примерно десятикратный прирост фотостабильности при микроскопии в живых клетках и 80-кратный – при облучении очищенного белка *in vitro* в окислительных условиях [31]. Вместе с тем, замена Y145L привела к существенному смещению pH-равновесия в окружении хромофорной группы, доминированию нефлуоресцирующей нейтральной формы хромофора (максимум поглощения – около 400 нм) и, как следствие, – снижению яркости мутанта по сравнению с исходным EGFP (рис. 1). Более того, EGFP-Y145L способен к фотоактивации (по-видимому, за счет светозависимого депротонирования хромофора). Эти факторы снижают его ценность как фотостабильного маркера.

Один из возможных подходов к повышению яркости EGFP-Y145L – снижение эффективности протонирования хромофора, которое, предположительно, может быть достигнуто введением дополнительных аминокислотных замен, описанных ранее как влияющие на кислотность хромофора GFP.

Интерес с точки зрения влияния на pKa хромофора GFP представляет остаток серина-205. Контактируя через молекулу структурной воды с Tyr66 хромофора [32–34], он играет важную роль в

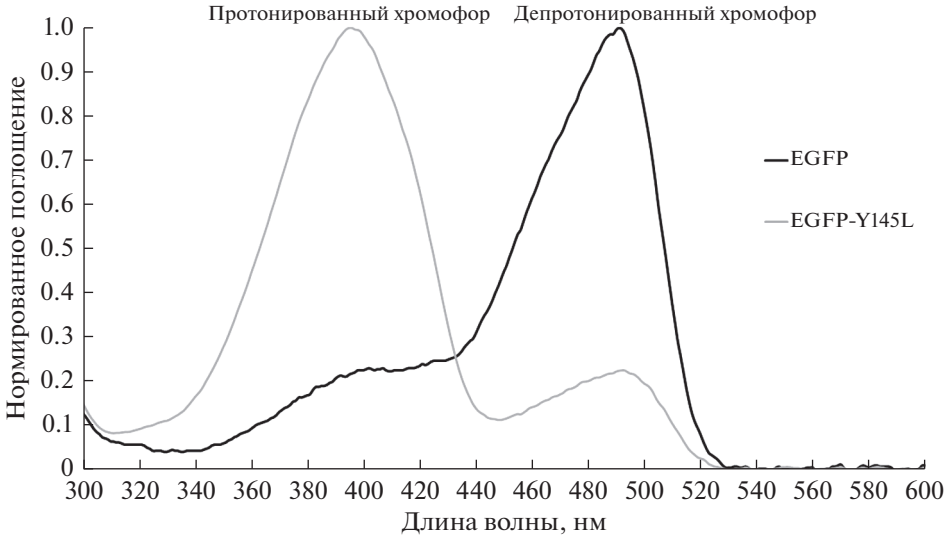


Рис. 1. Спектры поглощения белков EGFP и EGFP-Y145L.

светоиндуцированном переносе протона (ESPT), а также влияет на протонирование хромофора в основном состоянии [35]. Мутации по этому положению способны привести к существенной реорганизации сети водородных связей в хромофорном окружении [36, 37]. Так, в avGFP замена серина в 205 положении на валин замедляет кинетику ESPT [36–38], в белке SiriusGFP способствует смещению pH-равновесия хромофора в сторону депротонирования [39]. Более того, в случае хлоридного сенсора mClY, разработанного на базе желтого флуоресцентного белка YFP (несущего хромофор типа GFP), и зеленого ФБ SiriusGFP, близкого гомолога EGFP, введение замены Ser205Val приводит к существенному увеличению фотостабильности белка [36, 40].

Второй аминокислотный остаток, ставший мишенью для мутагенеза в настоящей работе, – глутамат-222. Заместитель по 222 положению высоко консервативен в природных ФБ и, наряду с аргинином-96, считается важной структурной детерминантой созревания хромофора [41–43], стабилизации зрелого хромофора во флуоресцентном состоянии [32, 43] и, в конечном счете, комплекса физико-химических характеристик ФБ [44–46]. Однако с точки зрения поставленных нами задач глутамат-222 интересен прежде всего своим участием во внутрибелковом транспорте протона, как в основном [47], так и в возбужденном электронном состоянии хромофора [33, 34, 42, 48]. В частности, Glu222 рассматривается как терминальный акцептор протона в нативной цепи ESPT avGFP [49]. Замена глутамата в 222 положении на незаряженный глутамин блокирует ESPT [49], действуя подобно мутации S65T первой аминокислоты хромофорной триады (при введении последней карбоксильная группа глутамата переориентируется в сторону от Tyr66 хромофора [4, 50]). Наибольший интерес для нас представляет замена E222G, которая была описана еще в составе ранних мутантов avGFP как подавляющая протонирование хромофора [32, 52]. Позже эта же мутация была выявлена в экспериментах по направленной белковой эволюции acGFPL, бесцветного GFP-подобного белка из гидромедузы *Aequorea coerulescens*, где она позволила получить яркий белок aceGFP, хромофор которого в физиологическом диапазоне pH находится строго в ионизованном состоянии [53]. Кроме того, E222G может блокировать дополнительный канал фотоокисления хромофора, исключая из цепи переноса электрона потенциальный акцептор (ионизованный остаток Glu222) [54]. Наша работа по анализу вовлеченных в светоиндуцированный транспорт электрона в EGFP аминокислотных остатков не подтверждает роли Glu222 [31], однако если гипотеза Saha et al. верна, то мутация E222G может не только способствовать депротонированию хромофора, но и улучшать фотостабильность белка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мутация S205V

Мы предположили, что внесение мутации S205V в EGFP-Y145L может не только сместить pKa хромофора в кислую область, восстановив яркость флуоресценции за счет преобладания анионной формы, но и способствовать сохранению высокой фотостабильности двойного мутанта. Анализ спектральных свойств EGFP-Y145L/S205V, однако, показал, что наше предположение оказалось неверным. В спектре поглощения мутантного варианта с двумя заменами (рис. 2*а*) доминировала нейтральная форма хромофора с максимумом погло-

Таблица 1. Кинетические характеристики затухания флуоресценции EGFP, Y145L и Y145L/S205V при возбуждении анионного хромофора

Белок	Режим возбуждения*	τ_1, ps	A_1, %	τ_2, ps	A_2, %
EGFP	1P	2760 ± 6	100	–	–
	2P	2725 ± 7	100	–	–
Y145L	1P	2630 ± 7	100	–	–
	2P	2565 ± 5	100	–	–
Y145L/S205V	1P	1925 ± 20	58	627 ± 10	42
	2P	2070 ± 25	55	710 ± 30	45

* 1P – однофотонное возбуждение (490 нм); 2P – двухфотонное возбуждение (980 нм).

щения 395 нм, примерно в 15 раз превосходящим по амплитуде пик анионного хромофора, сдвинутый на ~10 нм в красную область по сравнению с соответствующим пиком EGFP (рис. 2*а*, табл. 3). Спектры флуоресценции (рис. 2*б*) демонстрируют заметный (~5 нм) батохромный сдвиг максимума эмиссии (при возбуждении на 470 нм), а также существенный (более 10 нм) сдвиг максимума возбуждения относительно EGFP. Кроме того, у EGFP-Y145L/S205V хорошо выражен второй коротковолновый (390 нм) максимум возбуждения, свидетельствующий о протекании в этом мутанте ESPT, а также, возможно, о его способности к фотоактивации. При возбуждении флуоресценции EGFP-Y145L/S205V при $\lambda_{возб}$ = 395 нм в спектре эмиссии детектируется как синяя (454 нм), так и зеленая (511 нм) полоса (рис. 2*в*). Отличие в положении максимума эмиссии зеленой флуоресценции при коротковолновом возбуждении от такового при длинноволновом (511 нм против 516 нм) – характерный спектральный признак светозависимого переноса протона.

Измерение времен жизни флуоресценции EGFP-Y145L и EGFP-Y145L/S205V показало наличие в последнем двух мажорных флуоресцентных фракций с временами жизни 630–700 пс (в зависимости от режима возбуждения) и ~2 нс, соответственно (табл. 1). Примечательно, что кинетика затухания флуоресценции EGFP-Y145L и в однофотонном и в двухфотонном режиме хорошо аппроксимируется однокомпонентной экспоненциальной моделью с временем жизни ~2.6 нс, близким к таковому у EGFP, и соответствует прямой флуоресценции из анионной формы хромофора. Вероятно, в случае двойного мутанта кинетика затухания флуоресценции с временем жизни 2 нс также характеризует прямой S1-S0 переход анионного хромофора (с некоторым гашением в результате ESPT), а короткоживущая компонента – флуоресценцию нейтрального хромофора в синей области (~460 нм).

Мутантный белок EGFP-Y145L/S205V характеризуется чрезвычайно низкой квантовой эффективностью при возбуждении в синей области. Коэффициент экстинкции анионной формы хромофора составляет всего 2400 M^{-1} $см^{-1}$, а квантовый выход флуоресценции ($\lambda_{возб}$ = 500 нм) 0.2 (табл. 3). Таким образом, при флуоресцентной визуализации с помощью стандартных для GFP наборов светофильтров эффективная яркость флуоресценции этого белка будет составлять ~1% от таковой у EGFP. Результаты наших экспериментов по флуоресцентной микроскопии EGFP-Y145L/S205V как *in vitro*, с использованием белка, иммобилизованного на частицах металлоаффинной смолы, так и *in cellulo*, где белок экспрессировался в клетках линии HEK293T, подтверждают эти расчеты (данные не показаны). Кроме того, мы обнаружили, что двойной мутант способен к фотоактивации (см. главу Фотостабильность и фотоактивация).

Мутация E222G

В свою очередь, спектральные характеристики EGFP-Y145L/E222G говорят об искомом смещении кислотности хромофора в сторону депротонирования. Так, амплитуды пиков поглощения нейтрального (λ = 395 нм) и анионного (λ = 488 нм) хромофора у него соотносятся как 1 : 1.4, тогда как у исходного EGFP-Y145L это соотношение ~4 : 1 (рис. 3).

Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции мутантного белка с двумя заменами практически идентичны таковым для EGFP (данные не показаны), а кинетика затухания флуоресценции при возбуждении на 490 нм хорошо аппроксимируется однокомпонентной моделью с τ ~ 3.1 нс (см. табл. 2). Кроме того, в условиях флуоресцентной микроскопии изолированного белка (удельная мощность возбуждения ~1 $Вт/см^2$) мы не обнаружили у него признаков фотоактивации синим (470 ± 20 нм) светом. Относительная яркость флуоресценции EGFP-Y145L/E222G составляет ~70% яркости EGFP, уступая последнему в основном из-за невысокого квантового выхода флуоресценции анионной формы (см. табл. 3). В целом приведенные данные свидетельствуют о гомоген-

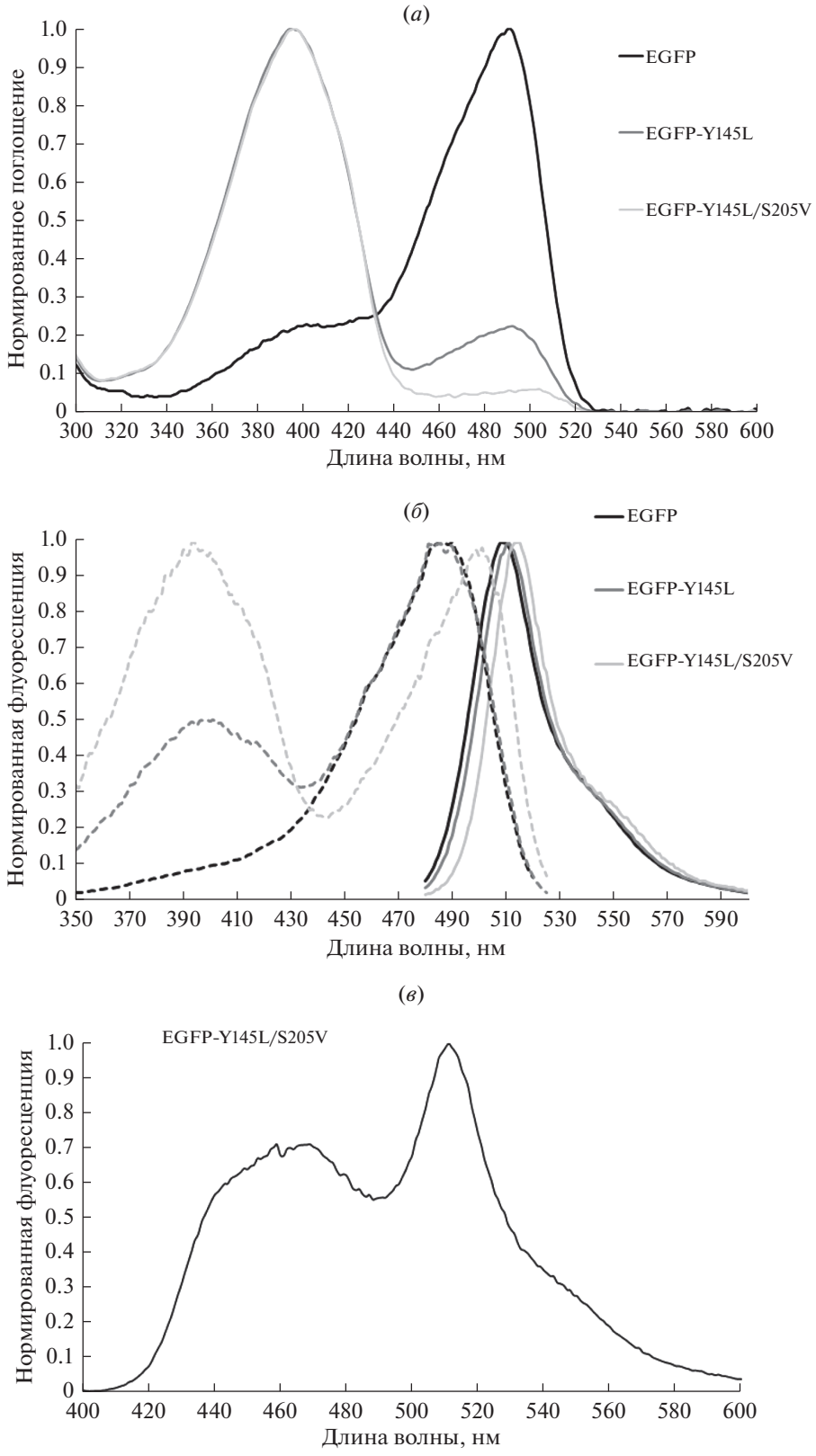


Рис. 2. (*а*) спектры поглощения белков EGFP, EGFP-Y145L и EGFP-Y145L/S205V. Максимумы поглощения протонированной формы хромофора ~395 нм, депротонированной (анионной) формы 490–500 нм. (*б*) спектры возбуждения (пунктир, λ_{em} = 530 нм) и эмиссии (сплошная линия, λ_{ex} = 470 нм) флуоресценции тех же флуоресцентных белков. По оси ординат отложен нормированный на максимальное значение флуоресцентный сигнал. (*в*) спектр эмиссии флуоресценции EGFP-Y145L/S205V при возбуждении 395 нм. По оси ординат отложен нормированный на максимальное значение флуоресцентный сигнал.

Таблица 2. Кинетические характеристики затухания флуоресценции EGFP-Y145L/E222G и Y145L/S205V/E222G при возбуждении анионного хромофора

Белок	Режим возбуждения*	τ_1, ps	A_1, %	τ_2, ps	A_2, %
Y145L/E222G	1P	3190 ± 12	100	–	–
	2P	3080 ± 10	100	–	–
Y145L/S205V/E222G	1P	2310 ± 23	75	644 ± 20	25
	2P	2420 ± 30	64	830 ± 40	36

* 1P – однофотонное возбуждение (490 нм); 2P – двухфотонное возбуждение (980 нм).

ности флуоресцентной популяции EGFP-Y145L/E222G и, соответственно, о возможности применения этого белка в качестве флуоресцентной метки в типовых экспериментах. Однако, согласно результатам спектрофотометрии, доля молекул EGFP-Y145L/E222G, несущих нейтральный хромофор, составила около 40%, а значит почти половина белка не флуоресцирует. Неполная компенсация заменой E222G смещенного в щелочную область pKa хромофора EGFP-Y145L, как мы полагаем, отражает комплексный и не всегда хорошо предсказуемый характер формирования физико-химических свойств ФБ. Детерминанты протонирования хромофора многочисленны [49], блокирование одних путей внутрибелкового переноса протона зачастую приводит к задействованию других. Более того, недавние структурные данные высокого разрешения, полученные на мутанте E222Q (эффект мутации похож на E222G) показывают, что статус протонирования Tyr66 хромофора не связан напрямую с системой водородных связей вокруг Thr65/Gln222 [55]. Допуская, что остаточное протонирование хромофора может быть связано с формированием новой сети водородных связей в хромофорном окружении и задействованием альтернативной цепи переноса протона, мы предположили, что серин-205 может играть роль донора или акцептора протона в молекуле EGFP-Y145L/E222G. Для проверки этого предположения мы сконструировали вариант EGFP, несущий три аминокислотные замены, – EGFP-Y145L/S205V/E222G. Оказалось, что по спектральным свойствам этот мутантный белок существенно ближе к EGFP-Y145L/S205V, чем к EGFP-Y145L/E222G. В его спектре поглощения (рис. 4*а*) доминирует полоса нейтрального хромофора (λ_{max} = 394 нм), а флуоресценция в зеленой области (λ_{max} = 515 нм) характеризуется бимодальным возбуждением (максимумы на 394 и 496 нм), свидетельствующем о протекании ESPT (рис. 4*б*). Впрочем, эффективность переноса протона в возбужденном состоянии, по всей видимости, невелика: на спектре эмиссии тройного мутанта, измеренном при возбуждении 395 нм заметен только синий пик (~455 нм, данные не показаны). EGFP-Y145L/S205V/E222G демонстрирует низкую яркость флуоресценции (~2% яркости EGFP) при возбуждении синим светом (см. табл. 3).

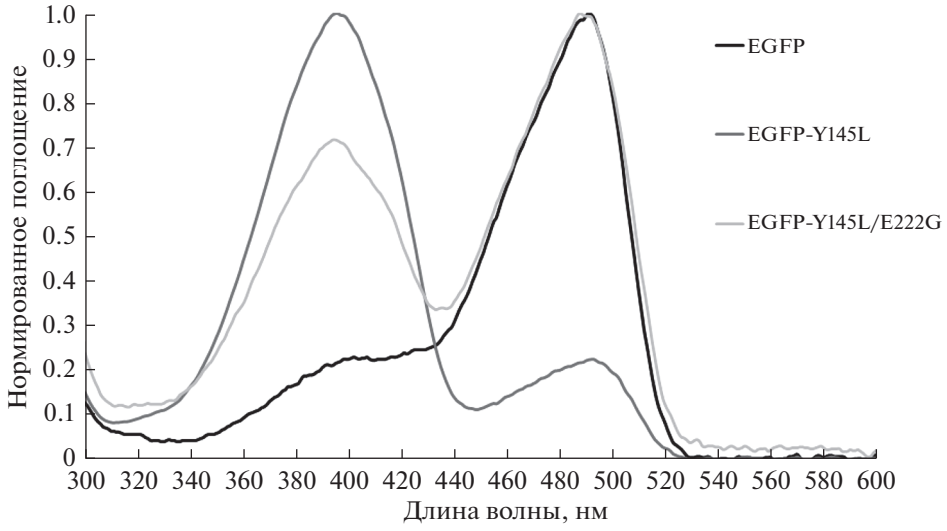


Рис. 3. Спектры поглощения белков EGFP, EGFP-Y145L и EGFP-Y145L/E222G. Максимумы поглощения протонированной формы хромофора ~395 нм, депротонированной (анионной) формы хромофора ~490 нм.

Сравнительная времяразрешенная спектроскопия вариантов EGFP-Y145L/E222G и Y145L/S205V/E222G (табл. 2) подтверждает выводы, сделанные при анализе стационарных спектров. Двойной мутант, как было упомянуто выше, формирует гомогенную фракцию с моноэкспоненциальным затуханием сигнала (τ ~ 3.1 нс), а у тройного появляется дополнительная короткоживущая компонента, связанная, по всей вероятности, с вкладом синей флуоресценции нейтрального хромофора. Степень гашения (укорочения времени жизни) флуоресценции анионного хромофора (τ ~ 2.3–2.4 нс), однако, выражены меньше, чем у EGFP-Y145L/S205V, что наряду со сравнительно небольшой амплитудой коротковолнового пика возбуждения (λ_{max} = 394 нм), дополнительно свидетельствует о сниженной относительно EGFP-Y145L/S205V эффективности ESPT.

Высокая доля протонированного хромофора в вариантах EGFP, несущих замену S205V, рассматривалась как один из ожидаемых исходов. Так, похожий спектральный портрет был описан для белка avGFP-S205V, который послужил моделью для изучения альтернативных путей переноса протона в GFP [37]. Более того, avGFP-S205V/T203V, в котором ESPT удалось заблокировать полностью, вообще не содержит анионной формы хромофора и флуоресцирует только в синей области спектра (459 нм) при возбуждении нейтрального хромофора.

Фотостабильность и фотоактивация

Мы измерили кинетики фотообесцвечивания всех упомянутых выше мутантных белков и их родоначальника EGFP в идентичных экспериментальных условиях (табл. 3). Оценка фотостабильности ФБ проводилась с помощью широкопольной флуоресцентной микроскопии с использованием стандартного набора светофильтров GFP (см. раздел Микроскопия главы Материалы и методы) в трех модельных системах. Первая из них – очищенный белок в нейтральном солевом буфере – является стандартной для измерения фотостабильности *in vitro* [16, 27, 56]; вторая – белок в присутствии одноэлектронного окислителя (феррицианида калия) хорошо зарекомендовала себя для выявления вклада в фотообесцвечивание окислительных процессов в возбужденном состоянии [31, 57, 58]; третья – белок, экспрессируемый живыми клетками HEK293T – вероятно, наиболее адекватно отражает фотостабильность маркера в условиях биологической визуализации. Отметим, что сравнение экспериментальных значений возможно только внутри наборов данных для каждой модельной системы.

Поведение белка EGFP-Y145L при фотообесцвечивании было подробно описано ранее [31], и данные, приведенные здесь, в целом повторяют предыдущие результаты. EGFP-Y145L чрезвычайно устойчив к обесцвечиванию, однако его слабая фотоактивация при облучении широкополосным синим светом приводит к некоторому завышению наблюдаемой фотостабильности. Визуализация EGFP-Y145L/E222G потребовала практически одинаковых с EGFP настроек чувствительности детектора. При сравнимой с родительским белком яркости этот мутант продемонстрировал существенно увеличенную относительно EGFP фотостабильность во всех трех модельных системах: в ~1.5 раза в солевом буфере, в ~5 раз с окислителем и в ~2 раза в живых клетках. Мы склонны связывать больший относительный эффект замедления фотообесцвечивания EGFP-Y145L/E222G в окислительных условиях *in vitro* с ролью мутации Y145L в блокировании светозависимого транспорта электрона. Оба мутантных варианта, несущих замену S205V, заметно фотоактивируются при измерении кинетики фотообесцвечивания (рис. 5). По этой причине характеристические времена фотообесцвечивания, приведенные для EGFP-Y145L/S205V и EGFP-Y145L/S205V/E222G в табл. 3, отражают не истинную, а кажущуюся фотостабильность этих флуорофоров. Такое поведение указанных белков вкупе с их низкой яркостью делает их мало пригодными для рутинной флуоресцентной визуализации.

Вместе с тем, фотоактивация вариантов с заменой S205V может представлять определенный интерес для научного сообщества, например, в контексте методов SMLM. Резонно предположить, что наблюдаемая фотоактивация связана со светоиндуцированным депротонированием хромофора, которое инициируется поглощением белков в фиолетовой области спектра (при флуоресцентной микроскопии мы используем фильтр BP470/40 на возбуждение). Механизм депротонирования может быть схож с таковым для хорошо охарактеризованной фотоактивации белка PAGFP (EGFP-T203H) [59–62], при которой вызванная ESPT ионизация хромофора сопровождается декарбоксилированием боковой цепи Glu222 с последующей перестройкой сети водородных связей, благоприятствующей стабилизации анионной формы хромофора. Однако, декарбоксилирование Glu222 в EGFP-Y145L/S205V/E222G невозможно. Кроме того, важной структурной детерминантой такой стабилизации является стекинг-взаимодействие остатка His203 с хромофором [9], отсутствующее в наших белках. Вероятно, в EGFP-Y145L/S205V и EGFP-Y145L/S205V/E222G реализуется альтернативный сценарий фотоактивации, изучение механизма которого требует дополнительных структурных изысканий. Для оценки эффективности и установления спектральных особенностей фотоактивации мы провели эксперимент, в котором облучали водный раствор очищенного EGFP-Y145LS/205V/E222G интенсивным фиолетовым

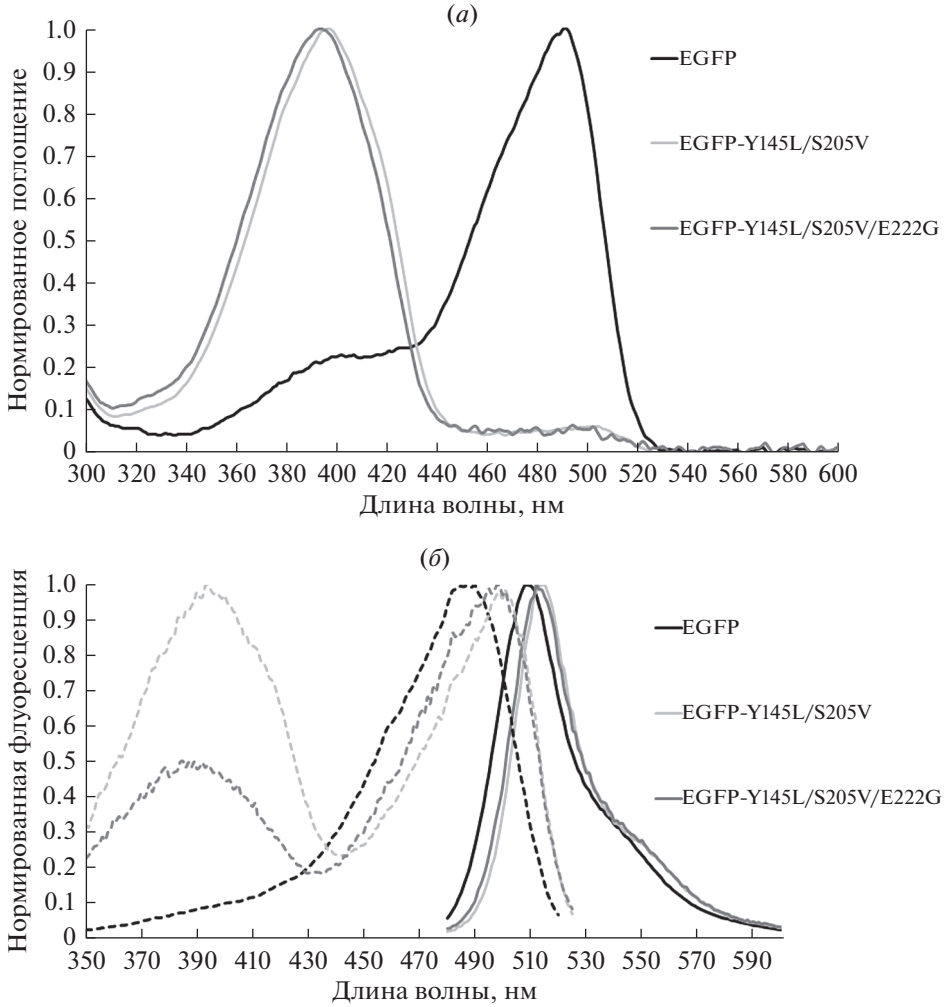


Рис. 4. Спектры поглощения белков EGFP, EGFP-Y145L/S205V и EGFP-Y145L/S205V/E222G. (*а*) максимумы поглощения протонированной формы хромофора ~395 нм, депротонированной (анионной) формы 490–500 нм. (*б*) спектры возбуждения (пунктир, λ_{em} = 530 нм) и эмиссии (сплошная линия, λ_{ex} = 470 нм) флуоресценции тех же флуоресцентных белков. По оси ординат отложен нормированный на максимальное значение флуоресцентный сигнал.

Таблица 3. Спектральные характеристики и фотостабильность EGFP и его мутантов

Белок	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$, нм	EC, M^{-1} $см^{-1}$	QY	RB, %	Фотостабильность[#]		
					in vitro, солевой буфер	*in vitro*, 500 мкМ феррицианид калия	*in cellulo*, клетки HEK293T
EGFP	488/509	55000	0.60	100	2.5 ± 1 мин	2.5 ± 0.3 с	35 ± 4 с
EGFP-Y145L	397 и 489/509	10400	0.52	16	7 ± 2 мин	45 ± 7 с	3.5 ± 1 мин
EGFP-Y145L/E222G	483/509	65000	0.36	71	3.5 ± 1 мин	12 ± 1.7 с	1 ± 0.5 мин
EGFP-Y145L/S205V	390 и 501/516	2400	0.20	1.5	35 ± 5 мин	10 ± 2 мин	9 ± 3 мин
EGFP-Y145L/S205V/E222G	394 и 496/515	2100	0.30	1.9	31 ± 8 мин	23 ± 5 мин	5 ± 2 мин

EC – коэффициент экстинкции анионной формы хромофора белка. QY – квантовый выход флуоресценции. RB – относительная яркость белка. Относительная яркость рассчитывается как произведение молярного коэффициента экстинкции и квантового выхода флуоресценции и дается по сравнению с яркостью EGFP. [#] Под фотостабильностью понимается время, за которое интенсивность флуоресценции снижалась на 50%. Для измерений фотостабильности в клетках $N \geq 20$.

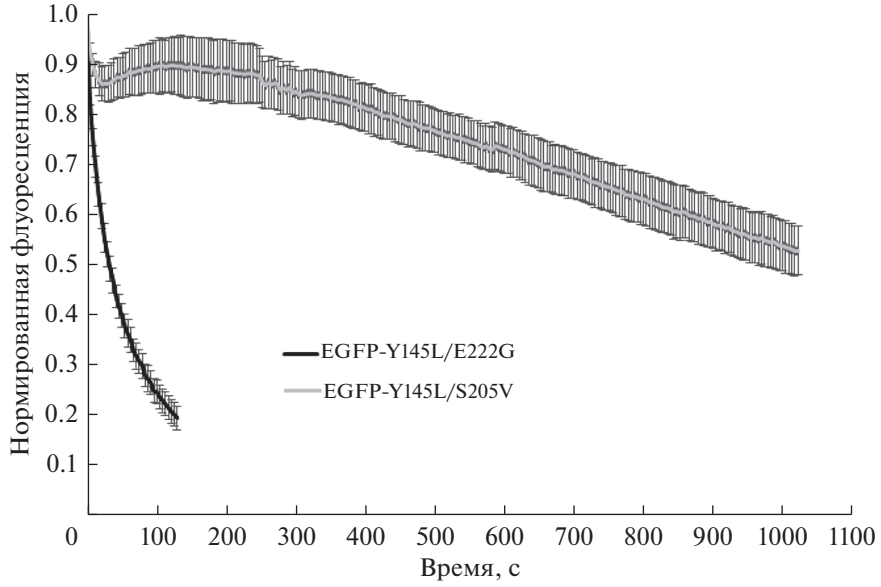


Рис. 5. Кинетика изменения интенсивности флуоресценции белков EGFP-Y145L/E222G и EGFP-Y145L/S205V *in vitro* в присутствии 500 мкМ $K_3[Fe(CN)_6]$. $N = 10$.

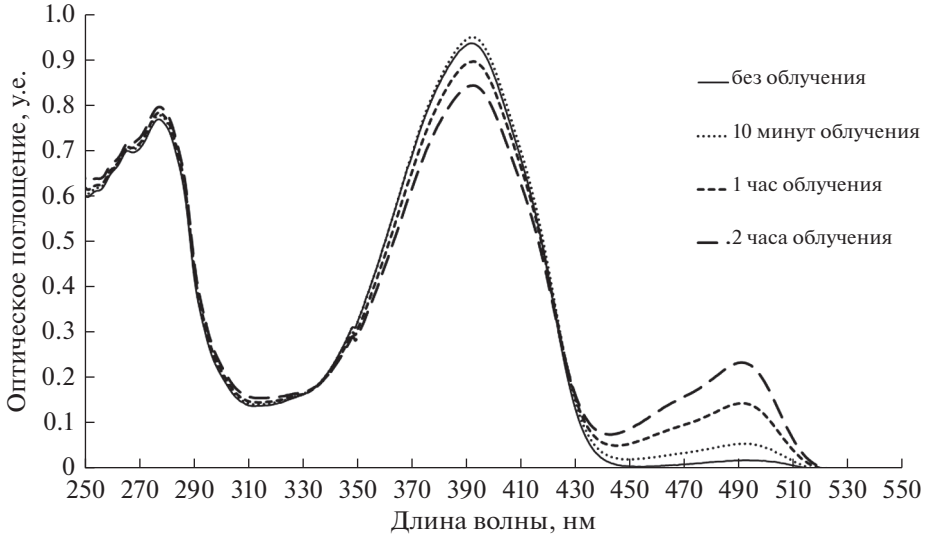


Рис. 6. Спектры поглощения мутанта EGFP-Y145L/S205V/E222G, полученные при облучении препарата белка коротковолновым (405 нм) интенсивным (~5.5 Вт/см^2) светом.

светом, с определенной периодичностью измеряя спектр поглощения раствора (рис. 6).

Как видно из результатов эксперимента, возбуждение нейтральной формы хромофора действительно приводит к постепенному увеличению популяции молекул с анионным ($\lambda_{погл}$ = 495 нм) хромофором. Фотоактивация EGFP-Y145L/S205V/E222G – не очень эффективный процесс, за 2 часа облучения поглощение анионной формы хромофора увеличилось только в 3–4 раза (для сравнения, при УФ-фотоактивации мутанта aceGFP-G222E достигалось 1000-кратное увеличение флуоресцентного сигнала [53]).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами было протестировано введение двух аминокислотных замен, представляющих собой важные детерминанты кислотности хромофора GFP – S205V и E222G – а также их комбинации как спо-

соб увеличения яркости фотостабильного мутанта EGFP-Y145L. Мутация S205V не оправдала наших ожиданий, она смещает pKa хромофора в щелочную область, способствует протонированию хромофора, протеканию ESPT. С другой стороны, мутантные белки с этой заменой могут быть интересны для изучения кинетики ESPT (возможно, что этот процесс в EGFP-Y145L/S205V протекает с задействованием альтернативного канала переноса протона). EGFP-Y145L/S205V и EGFP-Y145L/S205V/E222G – фотоактивируемые ФБ, вероятно, использующие не описанный ранее механизм фотоактивации. Их свойства могут найти применение в SMLM. Наконец, сложное фотоповедение вариантов с заменой S205V во временном домене, высокий вклад короткоживущих флуоресцентных популяций в пул регистрируемых фотонов, вкупе с выраженным протонированием хромофора при нейтральных pH, открывает перспективу их использования в качестве время-разрешенных сенсоров pH, особенно в щелочном диапазоне. Эффект мутации E222G, введенной в EGFP-Y145L, напротив, соответствовал нашим требованиям. Двойной мутант EGFP-Y145L/S205V/E222G – сравнительно яркий ФБ, сохраняющий повышенную в 1.5–5 раз по сравнению с родительским EGFP фотостабильность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сайт-направленный мутагенез

Мутанты EGFP были получены с использованием метода Overlap-extension PCR со следующим набором олигонуклеотидов, содержащим соответствующую замену: концевые праймеры – прямой 5'-ATGCGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3' и обратный 5'-ATGCAAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTC-3' для всех мутантных вариантов EGFP и прямой 5'-GAGTACAACCTGAACAGCCAC-3', обратный 5'-GTGGCTGTTCAGGTTGTACTC-3' для EGFP Y145L; прямой 5'-GTCCTGCTGGGCTTCGTGACC-3', обратный 5'-GGTCACGAAGCCCAGCAGGAC-3' для EGFP-E222G; прямой 5'-AGCACCCAGGTCGCCCTGAGC-3', обратный 5'-GCTCAGGGCGACCTGGGTGCT-3' для EGFP-S205V. Для бактериальной экспрессии амплифицированный с помощью ПЦР фрагмент, содержащий на концах сайты рестрикции BamHI/HindIII и кодирующий вариант ФБ, был клонирован в вектор pQE30 (Qiagen).

Экспрессия и очистка белка

EGFP, а также мутанты EGFP были клонированы в вектор pQE30 (Qiagen) с меткой 6His на N-конце, экспрессированы в штамме *E. coli* XL1 Blue (Invitrogen) и очищены с использованием металло-аффинной смолы TALON (Clontech). Для экспрессии в клетках млекопитающих использовали вектор EGFP-N1 (Clontech). Мутанты EGFP были клонированы в EGFP-N1 вместо EGFP. Клетки HEK293T (ATCC) трансфицировали перечисленными выше конструкциями для получения временной экспрессии белка.

Спектроскопия и оценка яркости флуоресценции

Для измерения спектров поглощения и возбуждения/эмиссии флуоресценции использовали спектрофотометр Cary 100 UV/VIS и флуоресцентный спектрофотометр Cary Eclipse (Varian). Яркость флуоресценции оценивали как произведение молярного коэффициента экстинкции и квантового выхода флуоресценции. Измерения всех нативных белков проводили в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS, pH 7,4, GIBCO). Для определения молярного коэффициента экстинкции мы использовали измерение концентрации зрелого хромофора. EGFP и его мутанты были денатурированы щелочью в 1 M NaOH. Известно, что в этих условиях GFP-подобный хромофор поглощает при 447 нм с коэффициентом экстинкции 44000 M^{-1} $см^{-1}$. На основе поглощения нативного и денатурированного щелочью белков были рассчитаны молярные коэффициенты экстинкции для нативных состояний. Для определения квантового выхода флуоресценции площади под кривой спектров эмиссии флуоресценции мутантов сравнивали с таковой для EGFP с тем же поглощением (квантовый выход 0.60).

Микроскопия

Для широкопольной флуоресцентной микроскопии использовалась система визуализации Leica AF6000 LX с ПЗС-камерой Photometrics CoolSNAP HQ. Флуоресцентные изображения получали с использованием масляного иммерсионного объектива 63× NA1.4 и стандартного набора фильтров GFP (возбуждение BP470/40, эмиссия BP525/50). Флуоресцентные белки, иммобилизованные на смоле TALON, и живые эмбриональные клетки почки человека 293 (HEK293T), культивируемые в среде DMEM (визуализацию также осуществляли в среде DMEM) и экспрессирующие целевые белки в цитоплазме, визуализировали и обесцвечивали с использованием следующих настроек: для детектирования сигнала (25–50 $мВт/см^2$, выдержка 10–100 мс) и для фотообесцвечивания (~1 $Вт/см^2$, выдержка 5 с). Фотообесцвечивание наблюдали при циклической съемке, чередуя съемку при низкой интенсивности света с воздействием облучения максимальной интенсивности (набор фильтров GFP). Изображения были получены и количественно оценены с использованием программ Leica LAS AF.

Микроскопия времени жизни флуоресценции очищенных белков при однофотонном и двухфотонном возбуждении

Для флуоресцентных белков, несущих анионные хромофоры, характерны расхождения спектральных свойств при однофотонном и двухфотонном поглощении [63]. Кроме того, описаны различия в кинетических характеристиках затухания флуоресценции в зависимости от режима возбуждения у зеленых ФБ с несколькими спектральными формами и светозависимыми переходами между этими формами [64]. Поэтому для расширения информативности анализа времяразрешенного сигнала измерение затухания флуоресценции всех белков мы проводили как в однофотонном, так и в двухфотонном режиме.

Фемтосекундные лазерные импульсы (частота 80 МГц, 100 фс, до 25 нДж на импульс) из Титан-Сапфирового осциллятора (Tsunami, Spectra-Physics), накачиваемого непрерывным зеленым Nd:YVO4 лазером (532 нм, Millennia Prime 6sJ, Spectra-Physics), преобразовывались во вторую гармонику в нелинейном кристалле бората бария (BBO, Model 3980, Spectra-Physics). Фемтосекундные лазерные импульсы на фундаментальной длине волны совмещалось с излучением второй гармоники через длинноволновое дихроичное зеркало (DMLP650, Thorlabs). Совмещенные лазерные пучки заводились в инвертированный оптический микроскоп Olympus IX71 через диэлектрический фильтр (FESH0750, Thorlabs) установленный под углом 45°, и фокусировались объективом (40× 0.75NA UPlanFLN, Olympus) на образец, который был помещен на 3-координатный столик. При каждом эксперименте был открыт только один из лазерных пучков. Образцы были приготовлены в виде капель очищенных флуоресцентных белков, растворенных в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7.4, GIBCO), нанесенных на стандартное покровное стекло 24 × 24 мм (Heinz Herenz, Germany). Средняя мощность лазера, достигающая образца, точно настраивалась с помощью поляризационного аттенюатора, состоящего из полуволновой пластины и поляризационного куба в каждом из пучков. Однофотонное возбуждение флуоресценции в образце производилось излучением второй гармоники при средней мощности до 10 мкВт на длине волны 490 нм. Двухфотонное возбуждение выполняли при длине волны 980 нм и средней мощности лазера до 10 мВт. Флуоресценция образца, возбуждаемого фемтосекундным лазером, в обоих режимах проходила обратно через объектив и фильтр, заводящий лазерное излучение, а затем направлялась на вход полихроматора Acton SP300i с двумя отдельными выходами. Для регистрации флуоресцентных спектров использовалась ПЗС-камера PI-MAX 2 (Princeton Instruments) на первом выходе монохроматора. Фотоэлектронный умножитель время-коррелированной системы счета фотонов SPC-730 (Becker & Hickl GmbH) на втором выходе детектировал кинетику затухания флуоресценции в спектральном диапазоне 510–530 нм. Данные о времени жизни флуоресценции были получены с использованием программного обеспечения SPC Image NG (Becker & Hickl, Germany), а затем экспортированы в формате ASCII и проанализированы с использованием программного обеспечения Origin Pro 9 (OriginLab, США).

БЛАГОДАРНОСТИ

Эксперименты были частично выполнены с использованием оборудования из фонда ЦКП ИБХ РАН (при поддержке гранта RFMEFI62117X0018 Министерства образования и науки России) и ЦКП ИХФ РАН (ЦКП 506694).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (генноинженерные работы и флуоресцентная микроскопия – грантом 19-04-00845 (руководитель А.М.Б.), стационарная и времяразрешенная спектроскопия – грантом 19-34-60019 (руководитель А.В.М.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *van Roessel P, Brand A.H.* // Nat. Cell. Biol. 2002. V. 4. P. 15–20. https://doi.org/10.1038/ncb0102-e15
2. *Shimomura O.* // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2009. V. 48. P. 5590–5602. https://doi.org/10.1002/anie.200902240
3. *Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C.* // Science. 1994. V. 263. P. 802–805. https://doi.org/10.1126/science.8303295
4. *Heim R., Cubitt A.B., Tsien R.Y.* // Nature 1995. V. 373. P. 663–664. https://doi.org/10.1038/373663b0

5. *Zhang G., Gurtu V., Kain S.R.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. V. 227. P. 707–711. https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1573
6. *Tsien R.Y.* // Annu. Rev. Biochem. 1998. V. 67. P. 509–544. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509
7. *Ai H.W., Shaner N.C., Cheng Z., Tsien R.Y., Campbell R.E.* // Biochemistry. 2007. V. 46. P. 5904–5910. https://doi.org/10.1021/bi700199g
8. *Kremers G.J., Goedhart J., van Munster E.B., Gadella T.W. Jr.* // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 6570–6580. https://doi.org/10.1021/bi0516273
9. *Henderson J.N., Gepshtein R., Heenan J.R., Kallio K., Huppert D., Remington S.J.* // J. Am. Chem. Soc. 2009. V. 131. P. 4176–4177. https://doi.org/10.1021/ja808851n
10. *Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zaraisky A.G., Markelov M., Lukyanov S.A.* // Nat. Biotechnol. 1999. V. 17. P. 969–973. https://doi.org/10.1038/13657
11. *Shcherbo D., Murphy C.S., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Chepurnykh T.V., Shcheglov A.S., Verkhusha V.V., Pletnev V.Z., Hazelwood K.L., Roche P.M., Lukyanov S., Zaraisky A.G., Davidson M.W., Chudakov D.M.* // Biochem. J. 2009. V. 418. P. 567–574. https://doi.org/10.1042/BJ20081949
12. *Bindels D.S., Haarbosch L., van Weeren L., Postma M., Wiese K.E., Mastop M., Aumonier S., Gotthard G., Royant A., Hink M.A., Gadella T.W., Jr.* // Nat. Methods. 2016. V. 14. P. 53–56. https://doi.org/10.1038/nmeth.4074
13. https://www.fpbase.org/.
14. *Nguyen A.W., Daugherty P.S.* // Nat. Biotechnol. 2005. V. 23. P. 355–360. https://doi.org/10.1038/nbt1066
15. *Goedhart J., von Stetten D., Noirclerc-Savoye M., Lelimousin M., Joosen L., Hink M.A., van Weeren L., Gadella T.W., Jr., Royant A.* // Nat. Commun. 2012. V. 3. P. 751. https://doi.org/10.1038/ncomms1738
16. *Shaner N.C., Steinbach P.A., Tsien R.Y.* // Nat. Methods. 2005. V. 2. P. 905–909. https://doi.org/10.1038/nmeth819
17. *Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A.* // Physiol. Rev. 2010. V. 90. P. 1103–1163. https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009
18. *Pédelacq J.-D., Cabantous S., Tran T., Terwilliger T.C., Waldo G.S.* // Nat. Biotechnol. 2005. V. 24. P. 79–88. https://doi.org/10.1038/nbt1172
19. *Cubitt A.B., Woollenweber L.A., Heim R.* // Methods Cell Biol. 1998. V. 58. P. 19–30. https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61946-9
20. *Shaner N.C., Lambert G.G., Chammas A., Ni Y., Cranfill P.J., Baird M.A., Sell B.R., Allen J.R., Day R.N., Israelsson M., Davidson M.W., Wang J.* // Nat. Methods. 2013. V. 10. P. 407–409. https://doi.org/10.1038/nmeth.2413
21. *Jradi F.M., Lavis L.D.* // ACS Chem. Biol. 2019. V. 14. P. 1077–1090. https://doi.org/10.1021/acschembio.9b00197
22. *Yan R., Moon S., Kenny S.J., Xu K.* // Acc. Chem. Res. 2018. V. 51. P. 697–705. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00545
23. *De Los Santos C., Chang C.W., Mycek M.A., Cardullo R.A.* // Mol. Reprod. Dev. 2015. V. 82. P. 587–604. . https://doi.org/10.1002/mrd.22501
24. *Мамонтова А.В., Григорьев А.П., Царькова А.С., Лукьянов К.А., Богданов А.М.* // Биоорган. химия. 2017. Т. 43. С. 598–607. [*Mamontova A.V., Grigoryev A.P., Tsarkova A.S., Lukyanov K.A, Bogdanov A.M.* // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2017. V. 43. P. 625–633.] https://doi.org/10.7868/S0132342317060021
25. *Seefeldt B., Kasper R., Seidel T., Tinnefeld P., Dietz K.J., Heilemann M., Sauer M.* // J. Biophotonics. 2008. V. 1. P. 74–82. https://doi.org/10.1002/jbio.200710024
26. *Duan C., Adam V., Byrdin M., Ridard J., Kieffer-Jaquinod S., Morlot C., Arcizet D., Demachy I., Bourgeois D.* // J. Am. Chem. Soc. 2013. V. 135. P. 15841–15850. https://doi.org/10.1021/ja406860e
27. *Shaner N.C., Lin M.Z., McKeown M.R., Steinbach P.A., Hazelwood K.L., Davidson M.W., Tsien R.Y.* // Nat. Methods. 2008. V. 5. P. 545–551. https://doi.org/10.1038/nmeth.1209
28. *Zhong S., Navaratnam D., Santos-Sacchi J.* // PLoS One. 2014. V. 9. P. e99095. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099095
29. *Ren H., Yang B., Ma C., Hu Y.S., Wang P.G., Wang L.* // ACS Chem. Biol. 2016. V. 11. P. 2679–2684. https://doi.org/10.1021/acschembio.6b00579
30. *Duan C., Byrdin M., El Khatib M., Henry X., Adam V., Bourgeois D.* // Methods Appl. Fluoresc. 2015. V. 3. P. 014004. https://doi.org/10.1088/2050-6120/3/1/014004
31. *Bogdanov A.M., Acharya A., Titelmayer A.V., Mamontova A.V., Bravaya K.B., Kolomeisky A.B., Lukyanov K.A., Krylov A.I.* // J. Am. Chem. Soc. 2016. V. 138. P. 4807–4817. https://doi.org/10.1021/jacs.6b00092
32. *Ormo M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J.* // Science. 1996. V. 273. P. 1392–1395. https://doi.org/10.1126/science.273.5280.1392
33. *Brejc K., Sixma T.K., Kitts P.A., Kain S.R., Tsien R.Y., Ormö M., Remington S.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1997. V. 94. P. 2306–2311. https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2306
34. *Palm G.J., Zdanov A., Gaitanaris G.A., Stauber R., Pavlakis G.N., Wlodawer A.* // Nat. Struct. Biol. 1997. V. 4. P. 361–365. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)05489-6
35. *Kennis J.T.M, Larsen D.S., van Stokkum I.H.M., Vengris M., van Thor J.J., van Grondelle R.* // PNAS 2004.

V. 101. P. 17988–17993.
https://doi.org/10.1073/pnas.0404262102

36. *Zhong S., Navaratnam D., Santos-Sacchi J.* // PLoS One. 2014. V. 9. P. e99095.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099095

37. *Shu X., Leiderman P., Gepshtein R., Smith N.R., Kallio K., Huppert D., Remington S.J.* // Protein Sci. 2007. V. 16. P. 2703–2710.
https://doi.org/10.1110/ps.073112007

38. *Simkovitch R., Huppert A., Huppert D., Remington S.J., Miller Y.* // J. Phys. Chem. B. 2013. V. 117. P. 11921–11931.
https://doi.org/10.1021/jp405698g

39. *Laptenok S.P., Lukacs A., Gil A., Brust R., Sazanovich I.V., Greetham G.M., Tonge P.J., Meech S.R.* // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2015. V. 54. P. 9303–9307.
https://doi.org/10.1002/anie.201503672

40. *Zhong S., Rivera-Molina F., Rivetta A., Toomre D., Santos-Sacchi J., Navaratnam D.* // J. Neurosci. Methods. 2019. V. 313. P. 68–76.
https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.12.008

41. *Barondeau D.P., Putnam C.D., Kassmann C.J., Tainer J.A., Getzoff E.D.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 12111–12116.
https://doi.org/10.1073/pnas.2133463100

42. *Sniegowski J.A., Lappe J.W., Patel H.N., Huffman H.A., Wachter R.M.* // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 26248–26255.
https://doi.org/10.1074/jbc.M412327200

43. *Craggs T.D.* // Chem. Soc. Rev. 2009. V. 38. P. 2865–2875.
https://doi.org/10.1039/b903641p

44. *Lin C.Y., Romei M.G., Oltrogge L.M., Mathews I.I., Boxer S.G.* // J. Am. Chem. Soc. 2019. V. 141. P. 15250–15265.
https://doi.org/10.1021/jacs.9b07152

45. *Nakano H., Okumura R., Goto C., Yamane T.* // Biotech. Bioproc. Eng. 2002. V. 7. P. 311–315.
https://doi.org/10.1007/BF02932841

46. *Banerjee S., Schenkelberg C.D., Jordan T.B., Reimertz J.M., Crone E.E., Crone D.E., Bystroff C.* // Biochemistry. 2017. V. 56. P. 736–747.
https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00800

47. *Brejc K., Sixma T.K., Kitts P.A., Kain S.R., Tsien R.Y., Ormö M., Remington S.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 2306–2311.
https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2306

48. *Oltrogge L.M., Wang Q., Boxer S.G.* // Biochemistry. 2014. V. 53. P. 5947–5957.
https://doi.org/10.1021/bi500147n

49. *Agmon N.* // Biophys. J. 2005. V. 88. P. 2452–2461.
https://doi.org/10.1529/biophysj.104.055541

50. *Stoner-Ma D., Jaye A.A., Matousek P., Towrie M., Meech S.R., Tonge P.J.* // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 2864–2865.
https://doi.org/10.1021/ja042466d

51. *Arpino J.A., Rizkallah P.J., Jones D.D.* // PLoS One. 2012. V. 7. P. e47132.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047132

52. *Ehrig T.F.G.P., O'Kane D.J.* // FEBS Lett. 1995. V. 367. P. 163–166.
https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00557-p

53. *Gurskaya N.G., Fradkov A.F., Pounkova N.I., Staroverov D.B., Bulina M.E., Yanushevich Y.G., Labas Y.A., Lukyanov S., Lukyanov K.A.* // Biochem. J. 2003. V. 373. P. 403–408.
https://doi.org/10.1042/BJ20021966

54. *Saha R., Verma P.K., Rakshit S., Saha S., Mayor S. and Pal S.K.* // Sci. Rep. 2013. V. 3. P. 1–7.
https://doi.org/10.1038/srep01580

55. *Takaba K., Tai Y., Eki H., Dao H.A., Hanazono Y., Hasegawa K., Miki K., Takeda K.* // IUCrJ. 2019. V. 6. P. 387–400.
https://doi.org/10.1107/S205225251900246X

56. *Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N., Palmer A.E., Tsien R.Y.* // Nat. Biotechnol. 2004. V. 22. P. 1567–1572.
https://doi.org/10.1038/nbt1037

57. *Bogdanov A.M., Mishin A.S., Yampolsky I.V., Belousov V.V., Chudakov D.M., Subach F.V., Verkhusha V.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A.* // Nat. Chem. Biol. 2009. V. 5. P. 459–461.
https://doi.org/10.1038/nchembio.174

58. *Sen T., Mamontova A.V., Titelmayer A.V., Shakhov A.M., Astafiev A.A., Acharya A., Lukyanov K.A., Krylov A.I., Bogdanov A.M.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 5229.
https://doi.org/10.3390/ijms20205229

59. *Patterson G.H., Lippincott-Schwartz J.* // Science. 2002. V. 297. P.1873–1877.
https://doi.org/10.1126/science.1074952

60. *van Thor J.J., Gensch T., Hellingwerf K.J., Johnson L.N.* // Nat. Struct. Biol. 2002. V. 9. P. 37.
https://doi.org/10.1038/nsb739

61. *Bell A.F., Stoner-Ma D., Wachter R.M., Tonge P.J.* // J. Am. Chem. Soc. 2003. V. 125. P. 6919–6926.
https://doi.org/10.1021/ja034588w

62. *Shcherbakova D.M., Verkhusha V.V.* // Curr. Opin. Chem. Biol. 2014. V. 20. P. 60–68.
https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.04.010

63. *Drobizhev M., Makarov N.S., Tillo S.E., Hughes T.E., Rebane A.* // Nat. Methods. 2011. V. 8. P. 393–399.
https://doi.org/10.1038/nmeth.1596

64. *Volkmer A., Subramaniam V., Birch D.J., Jovin T.M.* // Biophys. J. 2000. V. 78. P. 1589–1598.
https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76711-7

Increasing the Fluorescence Brightness of the Superphoto-Stable EGFP Mutant by Introducing Mutations Blocking the Chromophore Protonation

A. V. Mamontova*, A. M. Shakhov,**
A. P. Grigoryev*, K. A. Lukyanov****, and A. M. Bogdanov****,#**

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

**Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, Bol'shoi Bul'var 30/1, Moscow, 121205 Russia*

***Semenov Institute of Chemical Physics RAS, ul. Kosygina 4/1, Moscow, 119334 Russia*

****Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, Moscow, 119234 Russia*

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

The design of fluorescent proteins with increased photostability is an important practical task. One of the approaches to its solution is associated with the search for amino acid residues that play a key role in photochemical reactions involving the chromophore. Previously, the effect of tyrosine-145 on the photooxidation of the chromophore of the EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) was demonstrated. We designed the mutant EGFP-Y145L, in which the efficiency of photooxidation and associated photobleaching were significantly reduced. In this work, we are looking for the ways to increase the fluorescence brightness of this mutant, introducing S205V and E222G substitutions and their combination in order to shift the pH equilibrium of the chromophore environment towards ionization of the chromophore. We showed that both mutants with the S205V substitution carry mainly neutral chromophore, have low brightness and are capable of slow photoactivation. They may be of interest for studying light-dependent proton transfer and, possibly, function as time-resolved pH sensors. In the mutant EGFP-Y145L/E222G, as we expected, the chromophore resides predominantly in anionic form. This protein is characterized by a fluorescence brightness that is 4 times higher than that of the original EGFP-Y145L and photostability is 1.5–5 times higher than that of EGFP.

Keywords: fluorescent proteins, GFP, photostability, fluorescence spectroscopy, photoinduced oxidation, chromophore, excited state lifetime, ESPT

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 784–791

УДК 615.2,615.07,547.873,547.7

МЕТОД ПРОГНОЗА АНТИГЛИКИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПОСРЕДСТВОМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНЕРГИЙ ГРАНИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ОРБИТАЛЕЙ НА ПРИМЕРЕ НОВЫХ 4-ГИДРОКСИ-1,4-ДИГИДРОАЗОЛО[5,1-c]-1,2,4-ТРИАЗИНОВ

© 2020 г. Р. А. Литвинов*, #, Р. А. Дрокин, Д. Д. Шамшина*, М. Ю. Каленова*, Л. Э. Усмиянова*, Е. А. Муравьева*, П. М. Васильев*, Е. К. Воинков**, Е. Н. Уломский**, А. А. Спасов*, В. Л. Русинов****

**ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Россия, 400131 Волгоград, площадь Павших Борцов, 1*

***ФГАОУ ВО УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Россия, 620002 Екатеринбург, ул. Мира, 19*

Поступила в редакцию 09.04.2020 г.
После доработки 18.04.2020 г.
Принята к публикации 26.04.2020 г.

Гликирование белков является одним из патогенетических механизмов развития поздних осложнений сахарного диабета, прогрессирования некоторых нейродегенераций, болезней пожилого возраста. Ключевым патогенетическим фактором считается образование конечных продуктов гликирования (КПГ). Разработка модели прогноза антигликирующей фармакологической активности может улучшить качество и производительность скринингового этапа доклинических исследований новых соединений, активных при указанных заболеваниях. Азоло[5,1-c][1,2,4]триазины и азоло[1,5-a]пиримидины давно известны рядом полезных биологических активностей, в числе которых есть и антигликирующая. В связи с этим в качестве испытуемых соединений был выбран ряд ранее малоизученных 4-гидрокси-4H-азоло-1,4-дигидро[5,1-c]-1,2,4-триазинов. Установлено, что производные азолотриазина оказывают антигликирующее действие, препятствуя гликированию бычьего сывороточного альбумина (BSA) глюкозой, подавляя специфическую флуоресценцию КПГ в равной или большей степени, чем аминогуанидин. Диапазон активности в концентрации 1000 мкМ для различно замещенных производных составляет 23.0–71.6% (30.3 ± 1.2% для аминогуанидина). Наиболее активным показало себя соединение 4-гидрокси-3-циано-1,4-дигидро-1,2,4-триазоло[5,1-c][1,2,4]триазин. Уровни антигликирующей активности соединений (без учета аминогуанидина) коррелируют с величиной разницы энергий граничных молекулярных орбиталей $\Delta_{(HOMO-LUMO)}$ (принятые обозначения: HOMO – высшая занятая молекулярная орбиталь, LUMO – низшая вакантная молекулярная орбиталь), установленных полуэмпирически. Методом нейросетевого моделирования получена математическая модель, описывающая зависимость антигликирующей активности от расчетных энергий молекулярных орбиталей, вычисленных полуэмпирическим квантово-химическим методом. Установлено, что наибольший вклад в активность вносят энергия E_{LUMO} и $\Delta_{(HOMO-LUMO)}$. Модель может быть использована в будущем с целью прогноза данного вида активности.

Ключевые слова: гликирование, азолотриазины, граничные электронные орбитали, HOMO, LUMO, азолоазины, триазины

DOI: 10.31857/S0132342320060172

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) остается одной из значимых медико-социальных проблем. В мире насчитывается 463000000 людей с СД [1]. Арсенал средств, препятствующих формированию поздних осложнений сахарного диабета (ПОСД) не достаточен [2]. ПОСД приводят к потере трудоспособности даже на фоне скорректированной гликемии [3]. Основываясь на том, что в патогенезе ПОСД значительная роль отведена гликированию и образованию конечных продуктов гликирования (КПГ), имеющих негативное воздействие на организм,

Сокращения: СД – сахарный диабет; КПГ – конечные продукты гликирования; BSA – бычий сывороточный альбумин.

Автор для связи: (тел.: +7 (902) 361-87-70; эл. почта: litvinov.volggmu@mail.ru).

следует учитывать данный механизм при направленном дизайне новых лекарственных средств [4].

На ранних этапах доклинических исследований задача поиска новых биологически активных соединений осложнена необходимостью анализа большого количества образцов и отсева наименее перспективных. Лимитирующими факторами становятся длительность исследований и финансовые затраты на проведение большого числа испытаний. Расчетная оценка перспективности соединений позволяет прогнозировать биологическую активность, давая возможность отсеять представителей класса низкой перспективности. Однако компьютерное прогнозирование некоторых видов биологической активности – в частности антигликирующей – сопряжено с трудностями.

Антигликирующая активность является неспецифической, то есть не направленной ни на одну классифицируемую фармакологическую мишень. Реализация эффекта происходит благодаря механизмам связывания разнородных карбонильных соединений с образованием гидразинов, или ацетилирования аминогрупп, или за счет связывания свободных радикалов или элементов переходного ряда, то есть благодаря участию в биохимических и окислительно-восстановительных реакциях [5]. Различные механизмы, от реакций присоединения до антиоксидантных реакций, связанных с явлениями электронного перехода и отсутствие унифицированной мишени осложняют прогноз, поскольку моделирование многих биохимических реакций в программной среде – сложная задача.

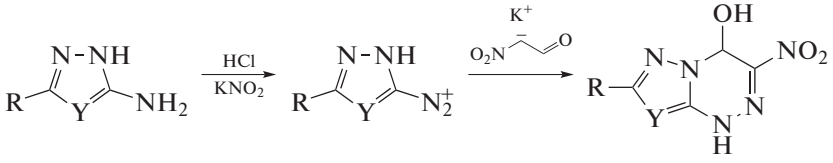
В соответствии с теорией возмущения молекулярных орбиталей [6], реакционная способность органических соединений в первом приближении обусловлена энергиями граничных молекулярных орбиталей – высшей занятой (HOMO) и низшей вакантной (LUMO). С учетом этого, для оценки *in silico* неспецифических биологических свойств химических соединений целесообразно использовать расчетные электронные параметры молекул и на их основе выполнять прогноз активности и проводить анализ молекулярного механизма действия.

В последнее время нами получены данные об антигликирующем и противодиабетическом действии производных азоло[5,1-c]-1,2,4-триазинов и азоло[1,5-a]-пиримидинов, а сама молекулярная основа может считаться привилегированной [7–10]. Таким образом указанные азолоазины являются перспективными объектами для разработки их синтеза и изучения антигликирующего действия в плане поиска препаратов для защиты от ПОСД. В то же время, следуя современным тенденциям, применение теории реакционной способности привлекает исследователей, прогнозирующих способность соединений препятствовать развитию ПОСД по механизму антигликирования [11]. В настоящей статье приводятся данные о синтезе и антигликирующей активности 4-гидрокси-1,4-дигидроазоло[5,1-c]-1,2,4-триазинов и предлагается разработанная с использованием этих данных методика прогноза антигликирующей активности, основанная на квантово-химическом расчете энергий граничных электронных орбиталей полуэмпирическим методом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтетическая часть

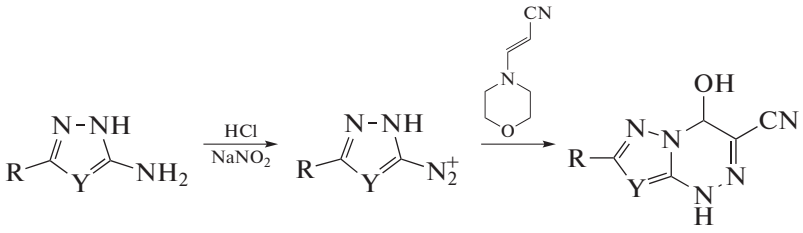
Для построения азоло-1,2,4-триазиновой структуры использована схема анелирования 1,2,4-триазинового цикла к азольному [12]. 3-Нитро-4-гидрокси-4H-азоло-1,4-дигидро[5,1-c]-1,2,4-триазины (**I**, **VI–X**) получены по разработанному нами ранее методу (схема 1) [13].



(**Ia**, **VIa–Xa**) (**I**, **VI–X**)

Схема 1.

Для синтеза 3-циано-4-гидрокси-4H-азоло-1,4-дигидро[5,1-c]-1,2,4-триазинов разработан метод с использованием в качестве синтона 1-морфолино-2-цианоэтилен [14]. 3-Циано-4-гидрокси-4H-азоло-4,7-дигидро[5,1-c]-1,2,4-триазины (**II–V**) ранее не описаны и представлены впервые. Данные структуры получены при взаимодействии 1-морфолино-2-цианоэтилена в ацетонитриле с солями азолилдиазония. Во избежание возможной побочной реакции диазоазолов с морфолином азасочетание проводят в кислой среде (схема 2).



(**IIa–Va**) (**II–V**)

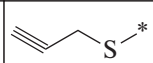
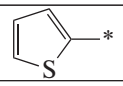
Соединение	Y	R
(**I**)	CCOOEt	H
(**II**)	CCOOEt	H
(**III**)	N	H
(**IV**)	N	SMe
(**V**)	N	Me
(**VI**)	N	H
(**VII**)	N	Me
(**VIII**)	N	
(**IX**)	N	
(**X**)	N	SMe

Схема 2.

В спектрах ^{1}H ЯМР соединений (**II–IV**) неизменно присутствуют характеристичные сигналы – сигнал протона H4 – атома триазинового кольца в области δ = 6.4–6.6 м.д., а также сигнал в области δ = 8.1–8.2 м.д. соответствующий гидроксильной группе – и сигналы протонов в азольном цикле. Аналогично в спектрах ^{13}C ЯМР присутствует характеристичный сигнал в области δ = 72–74 м.д. (C4). В ИК-спектрах соединений (**II–IV**) присутствует сигнал циано-группы в области 2230–2250 ν, см$^{-1}$.

Антигликирующая активность

В результате проведенных исследований установлено, что ряд соединений является перспективным в качестве антигликирующих агентов. Соединение 4-гидрокси-3-циано-1,4-дигидро-1,2,4-триазоло[5,1-c] [1,2,4]триазин оказалось наиболее активным в описываемом ряду, превосходя аминогуанидин более чем в 2 раза по величине проявленного эффекта в исследуемой корнцентрации. Данный результат согласуется с ранними исследованиями, показавшими, что производные класса азолоазинов являются перспективными представителями класса антигликирующих средств [7–10]. Результаты представлены в табл. 1.

Корреляционный анализ зависимости биологической активности соединений от их квантово-химических параметров

Исследование выполнено с применением полуэмпирического квантово-химического метода PM3 для вычисления энергий граничных молекулярных орбиталей соединений с последующим сопоставлением результатов расчетов с эксперимен-

тально установленными величинами антигликирующих активностей.

Актуальность подобного аналитического подхода ранее уже была продемонстрирована авторами настоящего исследования [9].

Проанализированы оптимизированные конформации 3D-моделей молекул, рассчитаны показатели энергий граничных молекулярных орбиталей и их разность. Результаты представлены в табл. 2.

При проведении корреляционного анализа между антигликирующей активностью соединений **I**–**X** и аминогуанидина и показателем $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$ установлено, что расчетные квантово-химические величины не коррелируют с величинами антигликирующей активности (непараметрический коэффициент корреляции Спирмена, $r_s = -0.382$, $p = 0.1380$). Исключение из анализа аминогуанидина позволило получить статистически значимую непараметрическую корреляцию ($r_s = -0.648$, $p = 0.0214$).

Отсутствие статистически значимой корреляционной связи с включением аминогуанидина в выборку данных свидетельствует о том, что закономерность, описывающая зависимость антигликирующего действия от энергетических характеристик граничных орбиталей молекул не универсальна и контекстно зависит от принципиально важных структурных особенностей изучаемых соединений, в данном случае, от наличия конденсированной ароматической системы.

Поскольку ранговая корреляция отражает не прямую линейную зависимость, а симбатность анализируемых показателей, и значения коэффициентов корреляции Спирмена не очень велики, нами для построения более точной нелинейной модели была использована методология искусственных нейронных сетей.

Анализ зависимости биологической активности соединений от их квантово-химических параметров с помощью технологии искусственных нейронных сетей

С учетом сложного характера зависимости антигликирующей активности от параметров граничных орбиталей молекул, для построения ее более точной модели было использовано нейросетевое моделирование. Параметры наилучшей нейронной сети с архитектурой многослойного перцептрона, полученной при расчетах в стандартном режиме в программе Statistica 12 [15], представлены в табл. 3.

Анализ чувствительности этой нейросети показал, что наибольшее значение показателя (примерно одинаковой величины) присуще двум входным нейронам: E_{LUMO} (8.9) и $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$ (8.3); меньшую чувствительность показал нейрон ΔE_{HOMO} (7.0).

Таблица 1. Величины антигликирующей активности производных азолоазина

Соединения	Активность, %
(I)	63.5 ± 0.4*
(II)	30.1 ± 2.5*
(III)	71.6 ± 2*
(IV)	37.9 ± 3.3*
(V)	58.7 ± 2.1*
(VI)	40.4 ± 2.0*
(VII)	33.6 ± 5.9*
(VIII)	38.5 ± 0.7*
(IX)	55.6 ± 2.5*
(X)	23.0 ± 3.5
Аминогуанидин	30.3 ± 1.2*

* Статистически значимые различия, ANOVA, пост-тест Тукке, $p < 0.05$. Значения антигликирующей активности были кластеризованны методом k-средних (Statistica 12). В класс более активных соединений отнесены соединения **I**, **III**, **V**, **IX**. Остальные соединения при кластеризации были отнесены в класс менее активных.

Таблица 2. Расчетные квантово-химические характеристики производных азолоазина

Соединения	E_{HOMO}	E_{LUMO}	$\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$
(I)	−9.898	−1.553	−8.346
(II)	−9.562	−1.237	−8.325
(III)	−9.794	−1.238	−8.556
(IV)	−9.047	−1.261	−7.786
(V)	−9.716	−1.189	−8.527
(VI)	−10.150	−1.631	−8.520
(VII)	−10.037	−1.558	−8.478
(VIII)	−9.287	−1.530	−7.757
(IX)	−9.531	−1.576	−7.955
(X)	−9.179	−1.578	−7.602
Аминогуанидин	−9.282	0.9740	−10.256

Таким образом, в результате нейросетевого моделирования выявлен еще один квантово-химический параметр E_{LUMO}, существенно влияющий на величину антигликирующей активности (помимо $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$). Стоит отметить, что соотношение вкладов параметров в конечный результат может меняться зависимо от применяемого расчетного метода. Полуэмпирические методы менее затратны по времени и не требовательны к производительности компьютеров, как неэмпирические (*ab initio*). Однако с помощью метода *ab initio* ранее нами был установлен существенный вклад E_{HOMO} в наличие разных видов активностей, включая антигликирование [9].

Таблица 3. Сведения о нейронной сети, описывающей зависимость антигликирующей активности **I**–**X** и аминогуанидина от их параметров энергий граничных электронных орбиталей

Архитектура	Точность при проверке на выборках, %			Обучающий алгоритм	Функции		
	обучающая	тестовая	валидационная		ошибки	активационная скрытого слоя	активационная выходного слоя
MLP 3-5-2	88.9	100.0	100.0	BFGS 15	Entropy	Logistic	Softmax

Подводя итог, можно заключить, что в результате исследований показано наличие антигликирующей активности у новых соединений, производных азоло-1,2,4-триазина. Величина активности соответствует таковой (соединения (**II**), (**IV**), (**VII**), (**VIII**), (**X**)) или значительно превосходит по выраженности (соединения (**I**), (**III**), (**V**), (**VI**), (**IX**)) антигликирующую активность аминогуанидина в концентрации 1000 мкМ. Это указывает на высокую перспективность ряда соединений в качестве антигликирующих агентов. Наилучшие результаты были получены для соединения III (4-гидрокси-3-циано-1,4-дигидро-1,2,4-триазоло[5,1-c][1,2,4]триазин).

Также установлено, что уровень антигликирующих свойств соединений, а также анализируемого наравне с ними препарата сравнения аминогуанидина определяется энергетическими характеристиками молекулярных орбиталей. Наибольший вклад при этом вносит параметр E_{LUMO}, а также $\Delta E_{HOMO\text{-}LUMO}$. Полученные данные позволят давать прогнозную оценку антигликирующему действию азолоазинов в экспериментах *in silico*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

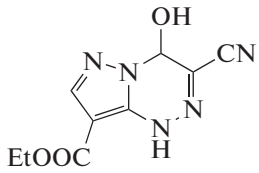
Экспериментальная химическая часть

ИК спектры записаны на спектрометре Bruker Alpha, ZnSe (НПВО). Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C сняты на приборе Bruker Avance II spectrometer (400 и 100 МГц соответственно) в DMSO-d_6, внутренний стандарт ТМС. Элементный анализ выполнен на приборе C,H,N,S-analizator Perkin Elmer 2400 Series II. Температуры плавления определены на приборе “Staffordshire, ST15 0SA” Контроль чистоты соединений осуществляли при помощи ТСХ на пластинках Silufol UV-254.

Соединения (**I**), (**VI**–**X**) были получены по ранее описанной методике [13].

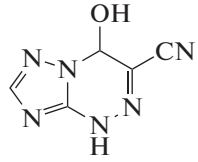
Общий метод синтеза 4-гидрокси-3-циано-1,4-дигидро-азоло[5,1-c][1,2,4]триазинов (II–V). К смеси (0.01 моль) амино-азола, 5 мл воды, 5 мл ацетонитрила и 10 мл конц. HCl (0.12 моль) порциями прибавляют раствор 0.75 г (0.011 моль) $NaNO_2$ в 3 мл воды при –7…–10°C. Реакционную массу выдерживают при этой температуре 10 мин и прибавляют к ней раствор 1.38 г (0.01 моль) 1-морфолин-2-цианоэтилена в 25 мл ацетонитрила. Смесь выдерживают при температуре 0°C 1 час, затем при комнатной температуре 6 часов. Реакционную смесь экстрагируют этилацетатом. Этилацетат упаривают досуха, осадок перекристаллизовывают из ацетонитрила, фильтруют и сушат на воздухе.

4-Гидрокси-3-циано-1,4-дигидро-пиразоло[5,1-c]этиловый эфир [1,2,4]триазин-8-карбоновой кислоты (II).



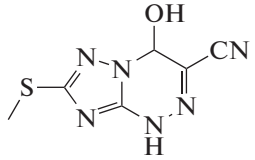
Выход 1.64 г (70%), порошок светло-коричневого цвета, имеет следующие физико-химические характеристики: $T_{пл}$ = 185–187°C (разл.); ^{1}H ЯМР спектр (в DMSO-d_6 δ, м.д.): 12.59 (с, H, NH), 8.10 (с, H, OH), 7.93 (с, H, CH), 6.41 (д, H, CH), 4.26 (кв, 2H, CH_2, J = 7.1 Гц), 1.28 (т, 3H, CH_3, J = 7.1 Гц); ^{13}C ЯМР спектр (в DMSO-d_6 δ, м.д.): 161.48, 140.86, 137.26, 117.97, 115.77, 95.83, 71.76, 59.85, 14.41. Найдено: C – 43.01; H – 4.44; N – 27.62. Брутто-формула – $C_9H_{11}N_5O_4$. Вычислено: C – 42.69; H – 4.38; N – 27.66., ИК, ν, см$^{-1}$ 2231(CN), 3176(OH), 3267(H_2O).

4-Гидрокси-3-циано-1,4-дигидро-1,2,4-триазоло[5,1-c][1,2,4]триазин (III).



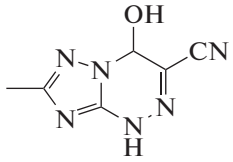
Выход 1.26 г (77%), порошок светло-коричневого цвета, имеет следующие физико-химические характеристики: $T_{пл}$ = 165–167°C (разл.); ^{1}H ЯМР спектр (в DMSO-d_6 δ, м.д.): 13.25 (с, H, NH), 8.12 (д, H, OH, J = 8.5 Гц), 7.96 (с, H, CH), 6.53 (д, 2H, J = 8.5 Гц, CH_2); ^{13}C ЯМР спектр (в DMSO-d_6 δ, м.д.): 150.58, 145.45, 117.77, 115.64, 73.64. Найдено: C – 36.88; H – 2.44; N – 51.62. Брутто-формула – $C_5H_4N_6O$. Вычислено: C – 36.59; H – 2.46; N – 51.21. ИК, ν, см$^{-1}$ 2227(CN), 3117(OH).

7-Метилсульфанил-4-гидрокси-3-циано-1,4-дигидро-1,2,4-триазоло[5,1-c][1,2,4]триазин (IV).



Выход 1.7 г (81%), порошок бежевого цвета, имеет следующие физико-химические характеристики: $T_{пл}$ = 175–177°C (разл.); ^{1}H ЯМР спектр (в DMSO-d_6 δ, м.д.): 13.30 (с, H, NH), 8.13 (д, H, OH), 6.46 (с, H, CH), 2.54 (с, 3H, CH_3); ^{13}C ЯМР спектр (в DMSO-d_6 δ, м.д.): 160.44, 146.11, 118.07, 115.40, 73.32, 13.52. Найдено: C – 33.98; H – 2.82; N – 39.62. Брутто-формула – $C_6H_6N_6OS$. Вычислено: C – 34.28; H – 2.88; N – 39.98. ИК, ν, см$^{-1}$ 2231(CN), 3098(OH).

7-Метил-4-гидрокси-3-циано-1,4-дигидро-1,2,4-триазоло[5,1-c][1,2,4]триазин (V).



Выход 1.25 г (71%), порошок бежевого цвета, имеет следующие физико-химические характеристики: $T_{пл}$ = 177–180°C (разл.); ^{1}H ЯМР спектр (в DMSO-d_6 δ, м.д.): 13.16 (с, H, NH), 8.03 (д, H, OH), 6.41 (с, H, CH), 2.23 (с, 3H, CH_3); ^{13}C ЯМР спектр (в DMSO-d_6 δ, м.д.): 159.12, 145.50, 117.45, 115.57, 73.07, 13.79. Найдено: C – 36.58; H – 4.07; N – 42.62. Брутто-формула – $C_6H_8N_6O_2S$. Вычислено: C – 36.76; H – 4.11; N – 42.84. ИК, ν, см$^{-1}$ 2246(CN), 3082(OH), 3482(H_2O).

Расчет квантово-химических параметров

Расчеты выполнены с использованием специализированной рабочей станции гибридной архитектуры (CPU + GPU) с пиковой производительностью 1.32 Tflops DP.

Построение первичных 3D-моделей изучаемых молекул выполняли и с помощью программы Chem3D [16] методом молекулярной механики в силовом поле MM2 [17] путем оптимизации конформации при вращении по всем подвижным связям. Окончательная оптимизация построенных таким образом конформеров была проведена полуэмпирическим квантово-химическим методом PM3 с помощью программы HyperChem [18]. В качестве характеристик реакционной способности молекул использовали расчетные значения энергий граничных орбиталей – высшей заполненной E_{HOMO} и низшей пустой E_{LUMO}, а также их разность $\Delta E_{HOMO\text{-}LUMO}$. Значения указанных показателей сопоставляли с экспериментальными данными по биологической активности.

Экспериментальная биологическая часть

При оценке антигликирующей активности проводили измерение флуоресценции КПГ на спектрофлуориметре TECAN M 200 Pro, λ(возбуждения) 370 нм, λ(испускания) 440 нм.

Активность определяли *in vitro* по методу [19]. Субстрат гликирования: бычий сывороточный альбумин (BSA), 1 мг/мл (ООО "ХИММЕД", Россия); индуктор гликирования: глюкоза безводная, 0.5 M (Sigma, США); среда протекания реакции: фосфатный буферный раствор (0.05 M, pH 7.4). Длительность и условия реакции: 24 ч, 60°C. Все вещества растворяли в DMSO (конечная концентрация – 3%). В исследуемые образцы добавляли изучаемые вещества в конечной концентрации 1000 мкМ, растворенные в 99% DMSO (конечная концентрация в реакционной среде 3%), в контрольные образцы добавляли соответствующий объем растворителя. После протекания реакции белок осаждали при помощи трихлоруксусной кислоты (10% в конечной реакционной среде при осаждении), и центрифугирования при 15000 об./мин. (4 мин, 4°C). Супернатант удаляли, осадок отмывали фосфатным буферным раствором. Повторное растворение проводили в фосфатном буферном растворе (0.05 M, pH 10.5). Спектр возбуждения/испускания детектируемых КПГ (370/440 нм соответственно) рассматривается как диапазон длин волн флуоресценции, характерный для многих КПГ [20]. В качестве вещества сравнения использовали известный ингибитор неферментативного гликозилирования – аминогуанидин [21]. Антигликирующую активность рассчитывали по отношению к показателю флуоресценции контрольных образцов. Вычисляли относительный показатель флуоресценции с учетом холостых проб BSA, проинкубированных с соединениями в отсутствии индуктора гликирования. Использовали формулу:

$$\mathrm{Fly} = 10^{(\lg 10(\mathrm{Exp}) - \lg 10(\mathrm{blank}))},$$

где Fly – относительный показатель флуоресценции, lg 10(Exp) и lg 10(blank) – фактические уровни флуоресценции образцов, содержащих индуктор гликирования, и соответствующих им проб, не содержащих таковой.

Величины относительных коэффициентов флуоресценции контрольных и опытных проб сравнивали статистически. Для количественного представления уровня проявленной активности определяли показатель Δ%:

$$\Delta\% = \left(1 - \mathrm{Fly}\left(\mathrm{exp}\right)/\mathrm{Fly}\left(\mathrm{contr}\right)\right).$$

Результаты оценки биологической активности проанализированы с применением ANOVA, постест Туке, при уровне значимости $p < 0.05$ и условии соблюдения нормальности распределения и равенства дисперсий подгрупп выборок, корреляционный анализ проведен с применением критерия Спирмена, при уровне значимости $p < 0.05$ (GraphPad Prism 7.0).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для изучаемого вида активности с помощью модуля Statistica Neural Networks [22] программы Statistica 12 были построены бинарные классификационные модели, связывающие градации уровня активности "высокая" или "низкая" с квантово-химическими параметрами исследуемых соединений. В настоящем исследовании целевой была архитектура сети в виде двухслойного перцептрона MLP *k*-*m*-2, где: *k* – число входных нейронов, т.е. квантово-химических параметров (E_{LUMO}, $\Delta E_{HOMO-LUMO}$, ΔE_{HOMO}); *m* – число скрытых нейронов, устанавливается программой от 3 до 5. В программе Statistica при построении перцептронных сетей для скрытого и выходного слоев используются пять наиболее распространенных активационных функций Identity, Logictic, Tanh, Exponential, Sine [22], попарный перебор которых осуществляется программой. Обучение нейросетей в программе Statistica проводится с использованием алгоритма обратного распространения ошибок. Размер обучающей/тестовой/валидационной выборок устанавливался с использованием генератора случайных чисел, в соотношении 60/20/20% соответственно от размера исходной выборки. Это обеспечивает соблюдение требования о соотношении размера выборки и числа входных нейронов. В нейросетевом моделировании считается, что на каждый входной нейрон должно приходиться 2 или более наблюдения. Число сетей для обучения составляло 2000, а число лучших автоматически отбираемых сетей – 100. После окончания обучения, из 100 отобранных программой лучших нейросетей по совокупности характеристик точности обучения/тестирования/валидации вручную отбирали наиболее валидные.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Биологические исследования, скрининг *in silico* и построение прогнозной модели выполнены при финансовой поддержке гранта Президента РФ МК-1887.2020.7. Химический синтез и определение строения структур выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № FEUZ-2020-0058 (Н687.42Б.223/20).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Diabetes Atlas 9th Edition. International Diabetes Federation, 2019. 29 p.
2. *Petrov V.I., Spasov A.A., Cheplyaeva N.I., Lenskaya K.V. Antidiabetogennyi potentsial benzimidazolov: khimiya, farmakologiya, klinika* (Antidiabetic Potential of Benzimidazoles: Chemistry, Pharmacology, and Clinical Use) // Eds. Spasov A.A., Petrov V.I., Minkin M.I. *Fundamental'nye osnovy poiska lekarstvennyh sredstv dlya terapii saharnogo diabeta 2-go tipa* (Fundamental Principles of Searching of Medicinal Products for Diabetes Mellitus Type 2 Therapy). Chapter 1. Volgograd: Vogograd. Gos. Med. Univ., 2016. [Original chapter in Rus.].
3. *Eid S., Sas K.M., Abcouwer S.F., Feldman E.L., Gardner T.W., Pennathur S., Fort P.E.* // Diabetologia. 2019. V. 62. P. 1539–1549. https://doi.org/10.1007/s00125-019-4959-1
4. *Rhee S.Y., Kim Y.S.* // Diabetes Metab J. 2018. V. 42. P. 188–195. https://doi.org/10.4093/dmj.2017.0105
5. *Sanchis P., Rivera R., Berga F., Fortuny R., Adrover M., Costa-Bauza A., Grases F., Masmiquel L.* // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 9619. https://doi.org/10.1038/s41598-018-27853-9
6. *Dewar M.J.S.* The PMO Theory of Organic Chemistry. Plenum, New York, 1975. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4404-9
7. *Rusinov V.L., Sapozhnikova I.M., Bliznik A.M., Chupakhin O.N., Charushin V.N., Spasov A.A., Vassiliev P.M., Kuznetsova V.A., Rashchenko A.I., Babkov D.A.* // Archiv der Pharmazie. 2017. V. 350. P. 1–15. https://doi.org/10.1002/ardp.201600361
8. *Spasov A.A., Babkov D.A., Sysoeva V.A., Litvinov R.A., Shamshina D.D., Ulomsky E.N., Savateev K.V., Fedotov V.V., Slepukhin P.A., Chupakhin O.N., Charushin V.N., Rusinov V.L.* // Archiv der Pharmazie. 2017. V. 350. P. e1700226. https://doi.org/10.1002/ardp.201700226
9. *Savateev K.V., Fedotov V.V., Butorin I., Eltsov O.S., Slepukhin P.A., Ulomsky E.N., Rusinov V.L., Litvinov R.A., Babkov D.A., Khokhlacheva E.A., Radaev P., Vasilev P.M., Spasov A.A.* // Europ. J. Med. Chem. 2020. V. 185. P. 111808. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111808
10. *Соколова Е.В., Хохлачева Е.А., Шамшина Д.Д., Батычек А.Е., Радаев П.А., Прокофьева Н.А., Литвинов Р.А., Бабков Д.А., Саватеев К.В., Федотов В.В.* // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2019. № 1. С. 79–82.

11. *Frau J., Glossman-Mitnik D.* // Molecules. 2017. V. 22. P. E226. https://doi.org/10.3390/molecules22020226
12. *Rusinov V.L., Charushin V.N., Chupakhin O.N.* // Russ. Chem. Bull. 2018. V. 67. P. 573. https://doi.org/10.1007/s11172-018-2113-8
13. *Voinkov E.K., Ulomskiy E.N., Rusinov V.L., Drokin R.A., Fedotov V.V., Gorbunov E.B.* // Mendeleev Comm. 2017. V. 27. P. 285–286. https://doi.org/10.1016/j.mencom.2017.05.023
14. *Rene L., Poncet J., Auzou G.* // Synthesis. 1986. 1986. P. 419–420. https://doi.org/10.1055/s-1986-31661
15. *Weib C.H.* // Software Review: Advances in Statistical Analysis. 2007. V. 91. P. 339–341.
16. PerkinElmer/Chemistry Database, http://www.cambridgesoft.com/. Accessed 08 Apr. 2020.
17. *Aped P., Senderowitz H.* Molecular Mechanics Calculations // PATAI'S Chemistry of Functional Groups / Ed. Rappoport Z. 2009. https://doi.org/10.1002/9780470682531.pat0071
18. HyperChem(TM) Professional 7.51, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA. http://www.hyper.com/. Accessed 08 Apr. 2020.
19. *Thornalley P.J.* // Arch. Biochem. Biophys. 2003. V. 419. P. 31–40. https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.08.013
20. *Beisswenger P.J., Howell S., Mackenzie T., Corstjens H., Muizzuddin N., Matsui M.S.* // Diabetes Technol. Ther. 2012. V. 14. P. 285–292. https://doi.org/10.1089/dia.2011.0108
21. *Jedsadayanmata A.* // Naresuan Univ. J. 2005. V. 13. P. 35–41.
22. Нейронные сети. Statistica Neural Networks: Методология и технология современного анализа данных / Под ред. Боровикова В.П. М.: Горячая линия Телеком, 2008. – 392 с.

Prediction of Chemical Compounds' Antiglycation Activity by the Frontier Molecular Orbitals' Energies Determination on the Example of Azolotriazine Derivatives Investigation

R. A. Litvinov*, #, R. A. Drokin, D. D. Shamshina*, M. Yu. Kalenova*, L. E. Usmianova*, E. A. Muraveva*, P. M. Vasiliev*, E. K. Voinkov**, E. N. Ulomskiy**, A. A. Spasov*, and V. L. Rusinov****

#Phone: +7 (902) 361-87-70; e-mail: litvinov.volggmu@mail.ru

**Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia*

***Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin, ul. Mira 19, Ekaterinburg, 620002 Russia*

Protein glycation and formation of advanced glycation end products (AGEs) play an important role in the pathogenesis of diabetes mellitus (DM) complications, neurodegenerations and age-related diseases. Prediction model for antiglycation activity can reduce costs and increase productivity and quality of screening investigations. Azolo[5,1-c][1,2,4]triazines and azolo[1,5-a]pyrimidines are well known biologically active compounds, which additionally have antiglycation properties. Hence, a number of 4-hydroxy-4H-azolo-1,4-dihydro [5,1-s]-1,2,4-triazines were selected for the prediction model creating. It has been established that azolotriazine derivatives have an anti-glycation effect, inhibiting a glycation of bovine serum albumin (BSA) by glucose with equal or greater activity than aminoguanidine. The activity range at 1000 μM concentration for variously substituted derivatives is 23.0–71.6% (30.3 ± 1.2% for aminoguanidine). The highest activity is detected for (4-hydroxy-4H-3-cyano-triazolo-1,4-dihydro[5,1-s]-1,2,4-triazines). The levels of antiglycation activity for the compounds (excluding aminoguanidine) correlate with the magnitude of the values of difference between HOMO and LUMO energies ($\Delta_{(HOMO-LUMO)}$, (HOMO – highest occupied molecular orbital, LUMO – lowest unoccupied molecular orbital), established by PM3 semi-empirical method. Using the method of artificial neural network modeling, a mathematical model for describing the dependence of antiglycation activity on the calculated energies is obtained. It has been established that the E_{LUMO} and $\Delta_{(HOMO-LUMO)}$ energies have the largest contribution to the activity. The model can be used for the prediction of antiglycation activity.

Keywords: glycation, azolotriazines, frontier molecular orbital, HOMO, LUMO, azoloazines, triazines

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 792–796

УДК 547.455.623'233.1+547.898

ОСОБЕННОСТИ МЕЖФАЗНОГО КАТАЛИТИЧЕСКОГО ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ 2-МЕРКАПТОБЕНЗИМИДАЗОЛА

© 2020 г. Т. А. Чупахина*, #, В. О. Курьянов*

***Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Россия, 295007 Симферополь, просп. Вернадского, 4**

Поступила в редакцию 27.03.2020 г.
После доработки 03.04.2020 г.
Принята к публикации 15.04.2020 г.

Исследована реакция 2-ацетамидо-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезокси-α-D-глюкопиранозилхлорида с 2-меркаптобензимидазолом в условиях межфазного катализа и выявлены особенности протекания межфазного процесса. Установлено, что основными продуктами глюкозаминилирования являются соответствующие *N*- и *S*-β-D-глюкозаминиды. Показано, что глюкозаминилирование 2-меркаптобензимидазола в межфазной каталитической системе "безводный хлористый метилен–гидрид натрия" протекает региоспецифично. Строение синтезированных соединений охарактеризовано с помощью ^{1}H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Ключевые слова: межфазный катализ, *глюкозаминилирование*, *гликозилирование*, *глюкозаминиды*, *краун-эфир*, *полиэтиленгликоль*

DOI: 10.31857/S0132342320060044

ВВЕДЕНИЕ

Синтез и исследование биологической активности веществ охватывает различные области современной органической химии. Большое влияние на биологическую активность оказывает присутствие в структуре соединений гетероциклического фрагмента. Так, бензимидазольный фрагмент присутствует в структуре многих препаратов с различной биологической активностью. Среди широко применяемых лекарственных средств следует упомянуть дибазол (спазмолитик), пимозид и дроперидол (нейролептики), астемизол (антигистаминный препарат), омепразол (противоязвенный препарат) и др. [1, 2]. В настоящее время для лечения заболеваний, вызываемых патогенными грибами, используется ряд различных по происхождению и механизму действия лекарственных препаратов. Наиболее многочисленную группу синтетических противогрибковых средств представляют производные азотсодержащих циклических соединений. Не стали исключением и соединения ряда бензимидазола [3]. В последнее время отмечена тенденция роста грибковых заболеваний и устойчивости возбудителей грибковых инфекций к имеющимся лекарственным препаратам. В связи с этим серьезное внимание уделяется поиску новых противогрибковых препаратов. Введение углеводных фрагментов в молекулы биологически активных гетероциклических соединений может послужить одним из примеров решения подобной проблемы и оказаться весьма перспективным. Ранее, в рамках изучения спектра биологической активности синтетических гликозидов, была показана определенная фунгицидная и фунгистатическая активность *S*- и *N*-β-глюкозаминидов меркапто-1,2,4-триазолов и 2-меркаптобензимидазолов методом диффузии и серийных разведений в жидкой питательной среде на тест-культурах дрожжевых грибов *Candida tenuis* и плесневых грибов *Aspergillus niger* [4]. Таким образом, избирательная модификация 2-меркаптобензимидазола, протекающая в различных условиях межфазной каталитической реакции с перацетатом α-D-глюкозаминилхлорида, представляет интерес с целью получения набора замещенных меркаптобензимидазолов с потенциальной биологической активностью.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами неоднократно в реакциях гликозилирования исследовались в качестве гликозил-акцепторов близкие структурные аналоги – тиолионные и амидо-имидольные таутомеры. Было показано, что в случае тиол-тионных таутомеров,

Сокращения: 15С5 – 15-краун-5; МФ – межфазный; МФК – межфазный катализ; Peg – полиэтиленгликоль.

Автор для связи: (тел.: +7 (978) 785-01-27; эл. почта: tachup@rambler.ru).

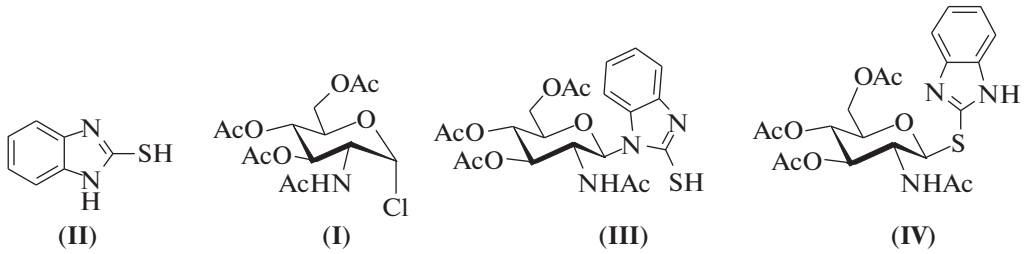


Рис. 1. Строение исходного субстрата (**I**), 2-меркаптобензимидазола и конечных гликозидов (**III**), (**IV**).

например, в качестве продуктов гликозилирования образуется либо смесь региоизомеров, либо только один из региоизомеров. Использование гликозил-донора, несущего соучаствующие группы у *C*2, обеспечивало строгую стереоселективность процесса [5, 6].

В научной литературе Э. Ашри с соавторами описал гликозилирование бензимидазол-2-тиона в различных условиях. Проведение процесса в среде безводного DMFA/ацетон в присутствии K_2CO_3 или Et_3N, в водной щелочи/ацетоне позволило авторам получить *S*-гликозид с выходами 51–71% [7].

Успешное применение катализируемой краун-эфирами МФ реакции α-D-глюкозаминилхлорида (**I**) с гетероароматическими соединениями [8] побудило нас к исследованию региоселективного процесса глюкозаминилирования 2-меркаптобензимидазола в условиях МФК.

Нами были последовательно изучены условия и состав продуктов МФ реакции α-D-глюкозаминилхлорида (**I**) с 2-меркаптобензимидазолом и однозначно доказано строение образующихся региоизомерных глюкозаминидов.

Реакцию α-хлорида (**I**) с 2-меркаптобензимидазолом проводили по методике, описанной нами ранее [9], используя безводные K_2CO_3 и ацетонитрил, при температуре 20–22°C и мольном соотношении (**I**)–(**II**)–K_2CO_3–15C5 равном 1 : 1 : 4.5 : 0.2. Обнаружено (ТСХ), что в условиях эксперимента конверсия гликозил-донора (**I**) в *N*-β- и *S*-β-глюкозаминиды (**III**) и (**IV**) происходила за 1.5 ч (рис. 1). Целевые соединения получены после очистки с помощью колоночной хроматографии с выходами 62 и 20% соответственно (табл. 1). В отсутствие межфазного катализатора процесс шел медленнее, и полная конверсия глюкозаминилхлорида (**I**) в продукты реакции завершалась за 5 ч. Выходы целевых гликозидов (**III**) и (**IV**) фактически остались прежними и составили 60 и 20% соответственно. Таким образом, использование 15C5 позволило сократить время реакции гликозилирования.

Известно, что олигоэтиленгликоли или полиэтиленгликоли, ввиду близости их химической природы, могут выступать как межфазные катализаторы во многих органических реакциях наряду с краун-эфирами [10]. Данное предположение нами также подтверждалось в изучении реакции глюкозаминилирования фенолов [11].

Поэтому следующим шагом в изучении обсуждаемой МФ реакции явилась замена катализатора межфазного переноса 15C5 на Peg (M_r 1500). Реакцию проводили при эквимолярном соотношении гликозил-донора (**I**) и гликозил-акцептора (**II**) в среде безводного ацетонитрила при использовании 4.5-кратного избытка твердого карбоната калия и 10 моль% Peg [11]. Конверсия глюкозаминилхлорида (**I**) в продукты глюкозаминилирования протекала за 3 ч. По данным ТСХ в реакционной среде были идентифицированы, как и в случае с 15C5, два основных продукта реакции. Выходы *N*-β- и *S*-β-гликозидов (**III**) и (**IV**) оказались сравнимы-

Таблица 1. Условия реакции глюкозаминилирования 2-меркаптобензимидазола, время 100%-ной конверсии субстрата (**I**) (по данным ТСХ) и выходы гликозидов (**III**), (**IV**)*

Гликозид**	Основание, моль	Катализатор, моль	Время реакции, ч	Выход (**III**)/(**IV**), %
$(\mathbf{III})^A$, $(\mathbf{IV})^A$	K_2CO_3, 4.5	15C5, 0.2	1.5	62/20
$(\mathbf{III})^B$, $(\mathbf{IV})^B$	K_2CO_3, 4.5	–	5	60/20
$(\mathbf{III})^C$, $(\mathbf{IV})^C$	K_2CO_3, 4.5	Peg, 0.1	3	64/19
$(\mathbf{III})^D$	NaH, 1	15C5, 0.2	2.5	65

* Мольное отношение α-хлорид (**I**) : 2-меркаптобензимидазол (**II**) = 1 : 1.
** Способ получения.

ми с выходами, полученными в первом случае, и составили 64 и 19% соответственно.

Так как условия реакции различных гликозилдоноров с гетероциклами могут существенно влиять на регионаправленность превращений [12], нами проведено глюкозаминилирование 2-меркаптобенимидазола α-D-глюкозаминилхлоридом (**I**) в среде безводного хлористого метилена в присутствии гидрида натрия и 15С5. Первоначально в стехиометрических условиях в течение часа выдерживали 2-меркаптобензимидазол и гидрид натрия (60% суспензия в парафиновом масле) в среде безводного хлористого метилена, после этого в реакционную смесь вносили 20 моль% 15С5 и эквимолярное количество гликозил-донора (**I**). Было обнаружено, что превращение α-хлорида (**I**) протекало с образованием единственного продукта реакции – *N*-β-гликозида (**III**). Процесс завершался за 2.5 ч с выходом продукта реакции 65% после очистки с помощью колоночной хроматографии.

Интенсивные пики молекулярных ионов $[M + H]^+$ с *m/z* 480 в масс-спектрах *N*-β- и *S*-β-гликозидов (**III**) и (**IV**) подтверждают введение углеводного остатка по одному из реакционных центров 2-меркаптобензимидазола и свидетельствуют о том, что гликозиды между собой являются изомерами. Для установления структуры и природы гликозидной связи в соединениях (**III**) и (**IV**), являющихся *S*- и *N*-глюкозаминидами, была привлечена ^{1}H-ЯМР-спектроскопия. 1,2-*транс*-Конфигурация гликозидной связи подтверждается наличием в их ^{1}H-ЯМР- спектрах дублетов аномерных протонов с химическими сдвигами 6.36 и 5.67 м.д. и константами спин-спинового взаимодействия 9.6 и 10.8 Гц. Отметим, что в ^{1}H-ЯМР-спектре *N*-гликозида (**III**) наблюдается смещение в слабое поле сигнала аномерного протона по сравнению с дублетом H-1 его региоизомера – *S*-глюкозаминида (**IV**). Аналогичное смещение идентифицировано и для оставшихся сигналов скелетных протонов гликозидного остаткав *N*-гликозида (**III**) по сравнению с изомерным (**IV**). Химические сдвиги сигналов протонов гликозидного и гетероциклического остатков соединений (**III**) и (**IV**) соответствовали значениям, полученным нами ранее [5, 8], и литературным данным [7, 12–14].

Таким образом, установлено, что МФ реакции α-D-глюкозаминилхлорида (**I**) с 2-меркаптобензимидазолом протекает региоспецифично в зависимости от условий реакции. Применение в качестве МФ катализатора 15С5 и альтернативная замена его на Peg приводит к получению смеси региоизомеров (**III**) и (**IV**) в системе "безводный ацетонитрил–карбонат калия", причем процесс образования *N*-гликозида является преобладающим. Образование *N*-гликозида (**III**) как единственного продукта реакции установлено в системе гидрид натрия – 15С5.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Температуры плавления определяли на приборе ПТП-1, оптическое вращение (20–22°C) – на поляриметре Polamat-A (длина волны λ, 546 нм). ^{1}H-ЯМР-спектры (δ, м.д.; КССВ, Гц) получены для растворов в DMSO-d_6 на приборе Varian Mercury-400 (400 МГц), внутренний стандарт – Me_4Si. ТСХ проводили на пластинках Sorbfil АФВ-УФ (Сорбполимер, Россия). Зоны веществ обнаруживали обработкой 2% раствором серной кислоты в пропан-2-оле с последующим нагреванием при 200–300°C. Использовали систему растворителей бензол–пропан-2-ол, 10 : 1 (система А), хлороформ–пропан-2-ол 10 : 1 (система В). Для разделения веществ колоночной хроматографией применяли Kieselgel 60 (0.063–0.200 мм, Merck). ESI+-MS регистрировали на масс-спектрометре Thermo Scientific MS/MS TSQ Quantum Access MAX.

α-D-Глюкозаминилхлорид (**I**) синтезировали по методике [15]. Ацетонитрил, дихлорметан и K_2CO_3 подготавливали, как описано нами ранее [9].

Общая методика гликозилирования в системе "твердый карбонат калия–ацетонитрил". К раствору 1.10 ммоль α-хлорида (**I**) в 12 мл CH_3CN добавляли 1.10 ммоль гликозил-акцептора (**II**) и 4.95 ммоль безводного тонкоизмельченного K_2CO_3, 0.22 ммоль или 0.11 ммоль соответствующего катализатора (15С5 [8], способ А, полиэтиленгликоль [10], способ С) и перемешивали при комнатной температуре до полного исчезновения гликозил-донора (**I**) (ТСХ, система А). Аналогично, в безводном CH_3CN, проводили гликозилирование 2-меркаптобензимидазола (**II**) в отсутствие катализатора (способ В). Твердую фазу отделяли фильтрованием, осадок промывали на фильтре ацетонитрилом (3 × 4 мл), растворитель удаляли при пониженном давлении. Выделяли целевые гликозиды (**III**) и (**IV**) колоночной хроматографией (градиентное элюирование хлороформ → хлороформ–изопропиловый спирт 100 : 1 → 10 : 1).

Гликозилирование по способу D. Смесь 0.82 ммоль 2-меркаптобензимидазола (**II**), 0.82 ммоль гидрида натрия в 9 мл безводного дихлорметана выдерживали 1 час при комнатной температуре. Затем в раствор гликозил-акцептора (**II**) вносили 0.16 ммоль 15С5, 0.82 ммоль α-хлорида (**I**) и реакционную смесь перемешивали до полной конверсии гликозил-донора (**I**) (ТСХ, система В). Твер-

дую фазу отделяли фильтрованием, осадок промывали на фильтре дихлорметаном (3 × 4 мл). Маточный раствор нейтрализовали катионитом КУ-2 (H^+), смолу отфильтровали, растворитель удаляли при пониженном давлении. Выделяли целевой гликозид (**III**), как описано выше.

1-(2-Ацетамидо-3,4,6-три-О-ацетил-2-дезокси-β-D-глюкопиранозил)-2-меркаптобензимидазол (**III**): получали из 0.4 г (1.1 ммоль) α-хлорида (**I**) и 165 мг (1.1 ммоль) 2-меркаптобензимидазола (**II**); т. пл. 252–254°C, $[\alpha]_{546}$ −106° (с 1.0; $CHCl_3$). ^{1}H ЯМР (DMSO-d_6): 1.61 (с, 3H, NAc), 1.94 (с, 3H, OAc), 2.05 (с, 9H, OAc), 4.16 (м, 3H, H-5, H-$6_{a,b}$), 4.67 (ддд, 1H, H-2, $J_{2,3}$ 9.6 Гц), 5.27 (дд, 1H, H-4, $J_{4,5}$ 9.6 Гц), 5.45 (дд, 1H, H-3, $J_{3,4}$ 9.6 Гц), 6.36 (д, 1H, H-1, $J_{1,2}$ 9.6 Гц), 7.20 (м, 4H, $CH_{аром}$), 7.92 (д, 1H, NH, $J_{2,NH}$ 8.8 Гц), 12.88 (с, 1H, SH). MS, *m/z*: 480 (479 + 1) ($M^+ + H^+$).

2-(2-Ацетамидо-3,4,6-три-О-ацетил-2-дезокси-β-D-глюкопиранозилтио)бензимидазол (**IV**): получали из 0.4 г (1.1 ммоль) α-хлорида (**I**) и 165 мг (1.1 ммоль) 2-меркаптобензимидазола (**II**); аморф., $[\alpha]_{546}$ −38° (с 1.0; $CHCl_3$). ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6): 1.78 (с, 3H, NAc), 1.85, 1.93, 1.97 (3с, 9H, 3OAc), 3.94 (ддд, 1H, H-5, $J_{5,6a}$, $J_{5,6b}$ 1.6, 4.8 Гц), 3.95, 4.16 (2 дд, 2H, H-6a,b, $J_{гем}$ 12.6 Гц), 4.05 (ддд, 1H, H-2, $J_{2,3}$ 9.6 Гц), 4.90 (дд, 1H, H-4, $J_{4,5}$ 9.2 Гц), 5.20 (дд, 1H, H-3, $J_{3,4}$ 9.6 Гц), 5.67 (д, 1H, H-1, $J_{1,2}$ 10.8 Гц), 8.25 (д, 1H, NH, $J_{2,NH}$ 9.6 Гц), 7.15, 7.41, 7.54 (2м, д, 4H, $CH_{аром}$), 12.53 (с, 1H, NH_{het}). MS, *m/z*: 480 (479 + 1) ($M^+ + H^+$).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования (Thermo Scientific MS/MS TSQ Quantum Access MAX), полученного по Программе развития ФГАОУ ВО “КФУ им. В.И. Вернадского” на 2015–2024 гг.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Машковский М.Д.* // Лекарственные средства: в 2-х т. / Ред. Литвина Н.А., Машковский С.А. М.: Новая волна, 2002.
2. *Andersson T.* // Clin. Pharmacokinet. 1996. V. 31. P. 9–28. https://doi.org/10.2165/00003088-199631010-00002
3. *Bouzard D.* // Antibiotics and Antiviral Compounds. Chemical Synthesis and Modification / Eds. Krohn R., Kirst H.A., Maag H. Weinheim: VCH Publishers Inc., 1993. P. 187–203.
4. *Курьянов В.О.* Глюкозаминиды: синтез, структура, свойства: дис. ... докт. хим. наук. Донецк, 2013. 351 с.
5. *Курьянов В.О. Чупахина Т.А., Земляков А.Е., Чирва В.Я., Шишкин О.В., Шишкина С.В., Котляр С.А., Камалов Г.Л.* // Журн. органічн. та фарм. хімії. 2006. Т. 4. С. 37–41.
6. *Курьянов В.О. Токарев М.К., Чупахина Т.А., Чирва В.Я.* // Биоорган. химия. 2011. Т. 37. С. 672–678. [*Kur'yanov V.O., Tokarev M.K., Chupakhina T.A., Chirva V.Ya.* // Russ. J. Bioorg. Chem.. 2011. V. 37. P. 602–608.] https://doi.org/10.1134/S1068162011050104
7. *El Ashry el S.H., Aly A.A., Aouad M.R., Amer M.R.* // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2010. V. 29. P. 698–706. https://doi.org/10.1080/15257770.2010.501777
8. *Курьянов В.О. Чупахина Т.А., Земляков А.Е., Чирва В.Я., Шишкин О.В., Шишкина С.В., Котляр С.А., Камалов Г.Л.* // Биоорган. химия. 2005. Т. 31. С. 511–518. [*Kur'yanov V.O., Chupakhina T.A., Zemlyakov A.E., Chirva V.Ya., Shishkin O.V., Shishkina S.V., Kotlyar S.A., Kamalov G.L.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2005. V. 31. P. 460–466.] https://doi.org/10.1134/S106816201204005X
9. *Чупахина Т.А.* Синтез и медико-биологические свойства *O-*, *S-* и *N*-гликозидов *N*-ацетилглюкозамина и их производных: дис. ... канд. хим. наук. Одесса, 2008. 245 с.
10. *Хираока М.* // Краун-соединения. Свойства и применение / Ред. Эммануэль Н.М. М.: Мир, 1986. С. 258–260.
11. *Курьянов В.О., Прискока У.С., Чупахина Т.А., Чирва В.Я.* // Биоорган. химия. 2005. Т. 31. С. 335–336. [*Kur'yanov V.O., Priskoka U.S., Chupakhina T.A., Chirva V.Ya.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2005. V. 31. P. 300–301.] https://doi.org/10.1007/s11171-005-0042-4
12. *Pistia-Brueggeman G., Hollingsworth R.I.* // Carbohydr. Res. 2003. V. 338. P. 455–458.
13. *Roy R., Tropper F.* // Synth. Comm. 1990. V. 20. P. 2097–2102.
14. *Flitsch S., Guilber B.* Regioselective Sulfation: US Patent 5874548. 1999. http://patft.uspto.gov/netahtml/search-bool.html.
15. *Лихошерстов Л.М., Новикова О.С., Деревицкая В.А., Кочетков Н.К.* // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1986. С. 1663–1669. [*Likhosherstov L.M., Novikova O.S., Derevitskaya V.A., Kochetkov N.K.* // Russ. Chem. Bull. 1986. V. 35. P. 1512–1517.] https://doi.org/10.1007/BF00954837
16. *Хортон Д.* // Методы исследования углеводов / Ред. Хорлин А.Я. М.: Мир, 1975. С. 221–224.

Features of Phase Transfer Catalytic Glycosylation of 2-Mercaptobenzimidazole

T. A. Chupakhina*, # and V. O. Kuryanov*

#Phone: +7 (978) 785-01-27; e-mail: tachup@rambler.ru

**Vernadsky Crimean Federal University, pr. Vernadskogo 4, Simferopol, Crimea, 295007 Russia*

The reaction of 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl chloride with 2-mercaptobenzimidazole under conditions of the phase transfer catalysis was investigated and the features of the phase transfer process were revealed. It was established that the main products of glucosaminylation are the corresponding *N*- and *S*-β-D-glucosaminides. It was shown that glucosaminylation of 2-mercaptobenzimidazole in the phase transfer catalytic system "anhydrous methylene chloride-sodium hydride" proceeds regiospecifically. The structure of the synthesized compounds was characterized using ^{1}H NMR spectroscopy and mass spectrometry.

Keywords: phase transfer catalysis, *glucosaminylation*, *glycosylation*, *glucosaminides*, *crown ether*, *polyethylene glycol*

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 6, с. 797–800

ПИСЬМО РЕДАКТОРУ

УДК 547.782

ПРОИЗВОДНЫЕ 6,7-ДИАЛКОКСИ-БЕНЗОТИОФЕНА В КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СЕНСОРОВ НА АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

© 2020 г. Я. В. Болт*, А. С. Царькова*, **, Н. С. Балеева*, #

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

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

Поступила в редакцию 18.04.2020 г.
После доработки 29.04.2020 г.
Принята к публикации 02.05.2020 г.

Производное диалкокси-бензотиофена предложено в качестве основы для создания флуоресцентных сенсоров на активные формы кислорода. Синтезирован соответствующий диоксид, который потенциально будет образовываться при детектировании. Показано, что благодаря заметному смещению максимумов поглощения и испускания, происходящему при окислении, подобные производные бензотиофена могут быть успешно использованы для создания флуоресцентных сенсоров.

Ключевые слова: редокс-процессы, активные формы кислорода, флуоресцентные сенсоры, бензотиофены

DOI: 10.31857/S0132342320060032

Редокс-процессы играют ключевую роль в биологических системах. Множество биохимических реакций зависит от регуляции такого типа превращений. Для аэробных организмов важнейшим инструментом регуляции выступает кислород и его активные формы (АФК). Синтез и перемещение АФК строго контролируется клеткой, так как такие реакционноспособные молекулы могут вызвать окислительные повреждения и привести к развитию патологий. В связи с этим АФК и их функции являются объектом детальных исследований многих научных коллективов [1–6]. Для детектирования АФК в живых системах сейчас доступны хроматографические и спектрофотометрические методы [7], люминесцентные индикаторы [8], электрохимические [8] и генетически кодируемые биосенсоры [9–12], а также флуоресцентные сенсоры [13, 14].

Среди флуоресцентных сенсоров на АФК очевидным образом стали распространены структурные модификации классических красителей, которые включают фрагменты, чувствительные к различным АФК. В подобной роли используются, например, производные цианина, флуоресцеина, кумарина, резоруфина или бензотиазола [15–18]. Как правило, взаимодействие подобных сенсоров с детектируемым объектом происходит необратимо, в результате либо образуются новые химические связи, либо разрушаются существующие. Это приводит к резкому изменению оптических свойств сенсора, например, к потере флуоресценции или наоборот приобретению интенсивной эмиссии, или же к заметному смещению положений максимумов поглощения и испускания.

В данной работе мы предложили в качестве основы для создания подобного типа сенсоров производное бензотиофена (**II**). Необходимое соединение (**II**) было получено при взаимодействии диметоксифенилтиола (**I**) с метилпропиолатом в присутствии азобисизобутиронитрила (схема 1). Затем под действием *мета*-хлорнадбензойной кислоты из бензотиофена (**II**) был получен соответствующий диоксид (**III**). Последний в свою очередь предположительно будет образовываться из исходного соединения (**II**) под воздействием АФК. Мы установили, что превращение производного (**II**) в диоксид (**III**) легко происходит под действием водного раствора пероксида натрия, а также при выдерживании его раствора на воздухе, что говорит о высокой перспективности использовании его как сенсора на АФК в живых системах.

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; *n*-BuLi – *н*-бутиллитий; AIBN – азобисизобутиронитрил; *m*CPBA – *мета*-хлорнадбензойная кислота.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (926) 704-13-72; эл. почта: nsbaleeva@gmail.com).

Таблица 1. Оптические свойства соединений (**II**) и (**III**) в разных растворителях

Соединение	Растворитель	Максимум поглощения, нм	Максимум эмиссии, нм	Коэффициент молярного поглощения, M^{-1} $см^{-1}$	Квантовый выход флуоресценции, %
(**II**)	Этанол	302	473	6500	17
	Ацетонитрил	300	444	6500	32
	Диоксан	302	421	6500	40
(**III**)	Этанол	358	497	4500	27
	Ацетонитрил	356	487	5000	31
	Диоксан	355	471	4500	28

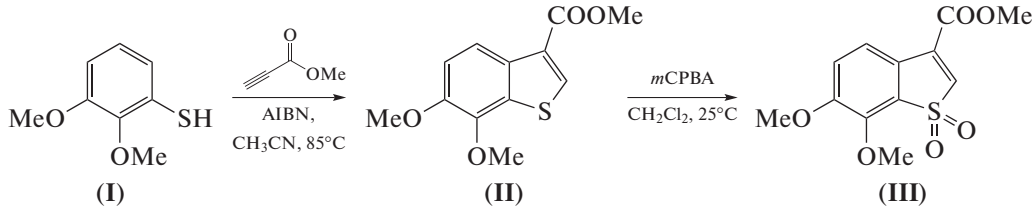


Схема 1. Схема синтеза производных (**II**) и (**III**).

Сравнение оптических свойств полученных соединений показало, что при переходе к окисленной форме (**III**) в спектрах абсорбции и эмиссии наблюдается заметное батохромное смещение положений максимумов (примерно на 40–60 нм) (табл. 1, рис. 1). Стоит отметить, что столь существенная разница позволит детектировать флуоресценцию диоксида, не наблюдая при этом сигнала исходного бензотиофена (например, при использовании лазера с длиной волны 388 нм, на рис. 1 отмечено*, а также фильтров DAPI или в двуфотонном режиме). Было установлено, что превращение исходного соединения (**II**) в диоксид (**III**) не оказывает влияния на другие оптические свойства – величины квантового выхода флуоресценции и коэффициента молярного поглощения практически не изменяются (табл. 1).

Полученные результаты позволяют заключить, что использование диалкокси-бензотиофена в качестве основы для создания флуоресцентных сенсоров на АФК представляется перспективным направлением для дальнейшей работы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР (δ, м.д.; *J*, Гц) зарегистрированы на приборе Bruker Fourier 300 (300 МГц, США) и Bruker Avance III (700 МГц, США) при 303 K в $CDCl_3$ и DMSO-d_6 (внутренний стандарт – Me_4Si). Спектры поглощения в УФ и видимом диапазоне

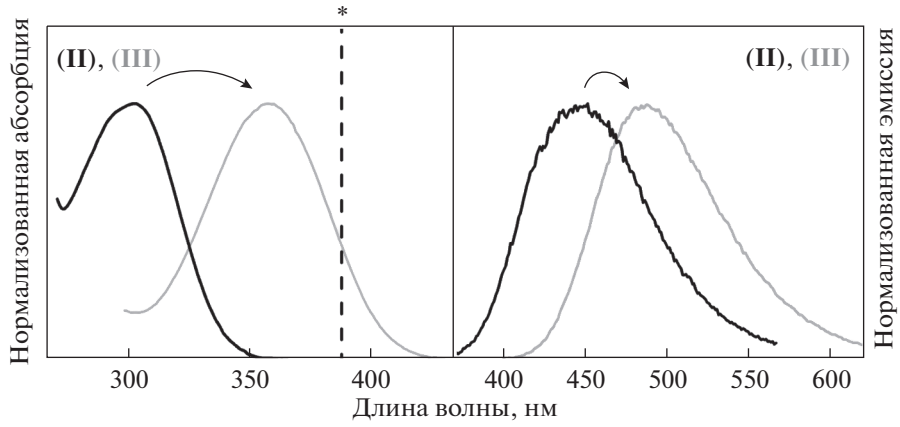


Рис. 1. Нормализованные спектры поглощения и испускания соединений (**II**) (черный) и (**III**) (серый) в ацетонитриле. (* Отмечена длина волны лазера, используемого в микроскопии.)

регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 *Bio* (США); спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (США). Температуры плавления определены на приборе SMP 30 (Великобритания) и не исправлены. Масс-спектры высокого разрешения записаны на приборе Bruker micrOTOF II, ионизация электрораспылением.

2,3-Диметоксифенилтиол (I). К раствору 1,2-диметоксибензола (5.77 г, 41.7 ммоль) в ТГФ (100 мл) в атмосфере аргона при −78°C прикапывали раствор *n*-BuLi в гексане (1 M, 39.1 мл, 62.6 ммоль), перемешивали при −78°C в течение 10 мин, затем нагревали до комнатной температуры и выдерживали 30 мин. Реакционную смесь охлаждали до −78°C, прибавляли S_8 (5.01 г, 5.0 ммоль) и нагревали до 0°C в течение 1 часа. Через 30 мин к реакционной смеси добавляли водный раствор соляной кислоты (1 M, 100 мл), экстрагировали этилацетатом (3 × 50 мл), промыли водой (3 × 50 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (3 × × 50 мл), высушили над безводным Na_2SO_4 и упарили в вакууме. Продукт очищали методом колоночной хроматографии (элюент – гексан–этилацетат, 100 : 3). Желтоватая жидкость (4.34 г, 61%); ^{1}H-ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): 6.94 (т, J_2 7.9, 1H), 6.86 (дд, J_2 7.9, 1.7, 1H), 6.71 (дд, J_2 8.0, 1.6, 1H), 3.87 (с, 3H), 3.86 (с, 3H) [19].

3-Метоксикарбонил-6,7-диметоксибензо[*b*]тиофен (II). К раствору 2,3-диметоксифенилтиола (**I**) (2.60 г, 15.27 ммоль) в ацетонитриле (250 мл) в атмосфере аргона добавляли метилпропиолат (13.6 мл, 152.7 ммоль) и азобисизобутиронитрил (0.50 г, 3.1 ммоль). Полученный раствор перемешивали при кипении в течение 2 часов. Ацетонитрил и избыток метилпропиолата упаривали в вакууме. Полученный продукт очищали методом колоночной хроматографии (элюент – гексан–этилацетат, 50 : 1). Затем продукт дополнительно очищали с помощью кристаллизации из пентана. Белый порошок (1.35 г, 35%); т. пл. около 260°C с разложением; ^{1}H-ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): 8.24 (д, J_2 8.6, 1H), 8.23 (с, 1H), 7.19 (д, J_2 8.9, 1H), 4.05 (с, 3H), 3.98 (с, 3H), 3.95 (с, 3H); ^{13}C-ЯМР (75 МГц, $CDCl_3$): 163.2, 148.7, 142.7, 135.3, 134.7, 133.6, 132.1, 127.2, 120.0, 113.7, 60.6, 56.9, 51.6; HRMS (ESI) *m/z*: найдено M 253.0538, рассчитано для $C_{12}H_{13}O_4S^+$, $[M + H]^+$ 253.0529.

3-Метоксикарбонил-6,7-диметоксибензо[*b*]тиофен-1,1-диоксид (III). Раствор 3-метоксикарбонил-6,7-диметоксибензо[*b*]тиофена **(II)** (100 мг, 0.39 ммоль) и *мета*-хлорнадбензойной кислоты (67 мг, 0.78 ммоль) в 2 мл сухого дихлорметана перемешивали при комнатной температуре в течение 8 ч. Затем реакционную смесь промывали насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (3 × 1 мл), водой (3 × 1 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (3 × 50 мл). Полученный раствор сушили над безводным Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Полученный продукт очищали методом колоночной хроматографии (элюент – хлороформ–метанол, 10 : 1). Бесцветное масло (84 мг, 75%); т. пл. около 260°C с разложением; ^{1}H-ЯМР (700 МГц, DMSO-d_6): 7.88 (с, 1H), 7.72 (д, J_2 8.4, 1H), 7.34 (д, J_2 8.6, 1.9, 1H), 3.96 (с, 3H), 3.91 (с, 3H), 3.88 (с, 3H); ^{13}C-ЯМР (176 МГц, DMSO-d_6): 162.1, 154.7, 145.2, 135.1, 132.6, 128.9, 121.2, 120.6, 117.4, 61.6, 56.7, 52.9; HRMS (ESI) *m/z*: найдено M 285.0431, рассчитано для $C_{12}H_{13}O_6S^+$, $[M + H]^+$ 285.0427.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-33-70266.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Liu H., Colavitti R., Rovira I.I., Finkel T.* // Circ. Res. 2005. V. 97. P. 967–974. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000188210.72062.10
2. *Hidalgo C., Bull R., Behrens M.I., Donoso P.* // Biol. Res. 2004. V. 37. P. 539–552. https://doi.org/10.4067/S0716-97602004000400007
3. *Tang X.D., Santarelli L.C., Heinemann S.H., Hoshi T.* // Annu. Rev. Physiol. 2004. V. 66. P. 131–159. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.041002.142720
4. *Winterbourn C.C., Hampton M.B.* // Free Radic. Biol. Med. 2008. V. 45. P. 549–561. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004
5. *Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y.* // Cell Signal. 2012. V. 24. P. 981–990. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008
6. *Forrester S.J., Kikuchi D.S., Hernandes M.S., Xu Q., Griendling K.K.* // Circ. Res. 2018. V. 122. P. 877–902. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401
7. *Zhang Y., Dai M., Yuan Z.* // Anal. Methods. 2018. V. 10. P. 4625–4638. https://doi.org/10.1039/C8AY01339J
8. *Chen X., Wang F., Hyun J.Y., Wei T., Qiang J., Ren X., Shin I., Yoon J.* // Chem. Soc. Rev. 2016. V. 45. P. 2976–3016. https://doi.org/10.1039/C6CS00192K

9. *Belousov V.V., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Staroverov D.B., Shakhbazov K.S., Terskikh A.V., Lukyanov S.* // Nat. Methods 2006. V. 3. P. 281–286. https://doi.org/10.1038/nmeth866

10. *Gutscher M., Sobotta M.C., Wabnitz G.H., Ballikaya S., Meyer A.J., Samstag Y., Dick T.P.* // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 31532–31540. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.059246

11. *Zhao Y., Jin J., Hu Q., Zhou H.M., Yi J., Yu Z., Xu L., Wang X., Yang Y., Loscalzo J.* // Cell Metab. 2011. V. 14. P. 555–566. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.09.004

12. *Pak V.V., Ezeriņa D., Lyublinskaya O.G., Pedre B., Tyurin-Kuzmin P.A., Mishina N.M., Thauvin M., Young D., Wahni K., Martínez Gache S.A., Demidovich A.D., Ermakova Y.G., Maslova Y.D., Shokhina A.G., Eroglu E., Bilan D.S., Bogeski I., Michel T., Vriz S., Messens J., Belousov V.V.* // Cell Metab. 2020. V. 31. P. 642–653. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.02.003

13. *Hyman L.M., Franz K.J.* // Coord. Chem. Rev. 2012. V. 256. P. 2333–2356. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.009

14. *Gomes A., Fernandes E., Lima J.L.* // J. Biochem. Biophys. Methods. 2005. V. 65. P. 45–80. https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003

15. *Wu L., Sedgwick A.C., Sun X., Bull S.D., He X.-P., James T.D.* // Acc. Chem. Res. 2019. V. 52. P. 2582–2597. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00302

16. *Liu F., Wu T., Cao J., Zhang H., Hu M., Sun S., Song F., Fan J., Wang J., Peng X.* // Analyst. 2013. V. 138. P. 775–778. https://doi.org/10.1039/C2AN36030F

17. *Odyniec M.L., Gardiner J.E., Sedgwick A.C., He X.-P., Bull S.D., James T.D.* // Front. Chem. Sci. Eng. 2020. V. 14. P. 117–121. https://doi.org/10.1007/s11705-018-1785-9

18. *Odyniec M.L., Sedgwick A.C., Swan A.H., Weber M., Tang T.M.S., Gardiner J.E., Zhang M., Jiang Y.-B., Kociok-Kohn G., Elmes R.B.P., Bull S.D., He X.-P., James T.D.* // Chem. Commun. 2018. V. 54. P. 8466–8469. https://doi.org/10.1039/C8CC04316G

19. *Aebisher D., Brzostowska E.M., Mahendran A., Greer A.* // J. Org. Chem. 2007. V. 72. P. 2951–2955. https://doi.org/10.1021/jo062677w

6,7-Dialcoxy-Benzothiophene Derivatives as the Basis for Synthesis of Fluorescent Sensors for Reactive Oxygen Species

Ya. V. Bolt*, A. S. Tsarkova*, **, and N. S. Baleeva*, #

#Phone: +7 (926) 704-13-72; e-mail: nsbaleeva@gmail.com

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

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

We suggest the use of the 6,7-dialcoxy-benzothiophene derivatives as the basis for synthesis of fluorescent sensors for reactive oxygen species. The corresponding dioxide – a potential product of oxidation, that might be generated during ROS detection, was synthesized. We have established that benzothiophene derivatives could be successfully used for synthesis of fluorescent sensors, due to the noticeable shift of the absorption and emission maxima that occurs during oxidation.

Keywords: redox reaction, reactive oxygen species, fluorescent sensors, benzothiophenes