

СОДЕРЖАНИЕ

Том 37, номер 5, 2020

ОБЗОРЫ

Фосфолипаза A2. Методы мониторинга активности

А. С. Алексеева, И. А. Болдырев

323

Взаимодействие границ упорядоченных липидных доменов и амфипатических пептидов регулирует вероятность образования пор в мембранах

К. В. Пинигин, М. В. Воловик, О. В. Батищев, С. А. Акимов

337

Влияние ионных токов плазматической мембраны на флуоресценцию хлорофилла и тушение возбужденных состояний в хлоропластах *Chara*

А. А. Бульчев, Н. А. Крупенина, А. А. Черкашин

350

Регуляция активированным протеином с пептидом-агонистом ПАР1 провоспалительной активации клеток линии RBL-2H3

И. И. Бабкина, Е. В. Киселева, Л. Р. Горбачева

361

Клеточная тест-система с генетически кодируемыми сенсорами цитоплазматического и ретикулярного кальция

П. Д. Котова, О. А. Рогачевская

373

Модуляция холестерин-зависимой активности макрофагов IC-21 CRAC-содержащими пептидами с заменами мотивообразующих аминокислот

А. Я. Дунина-Барковская, Х. С. Вишнякова

381

ПИСЬМА В РЕДАКЦИЮ

Влияние рафтов тонопласта на импорт ДНК в митохондрии клубней картофеля (*Solanum tuberosum*)

*Е. С. Клименко, И. С. Нестеркина, Н. В. Озолина, В. В. Гурина,
М. В. Кулинченко, Ю. М. Константинов*

396

Contents

Vol. 37, No. 5, 2020

REVIEWS

- Phospholipase A2. Methods for Monitoring Activity
A. S. Alekseeva, I. A. Boldyrev 323
-

- Interaction of Ordered Lipid Domain Boundaries and Amphipathic Peptides
Regulates Probability of Pore Formation in Membranes
K. V. Pinigin, M. V. Volovik, O. V. Batishchev, S. A. Akimov 337
- Influence of Plasma Membrane Ion Currents on Chlorophyll Fluorescence
and Quenching of Excited States in *Chara* Chloroplasts
A. A. Bulychev, N. A. Krupenina, A. A. Cherkashin 350
- Regulation of the Proinflammatory Activity of the RBL-2H3 Cells by Activated
Protein C and Peptide-Agonist of Protease-Activated Receptor 1 (PAR1)
I. I. Babkina, E. V. Kiseleva, L. R. Gorbacheva 361
- Cellular Test System with Genetically Encoded Indicators
of Cytosolic and Reticular Ca²⁺
P. D. Kotova, O. A. Rogachevskaja 373
- Modulation of the Cholesterol-Dependent Activity of Macrophages IC-21
by CRAC-Peptides with Substituted Motive-Forming Amino Acids
A. Ya. Dunina-Barkovskaya, Kh. S. Vishnyakova 381
-

SHORT COMMUNICATIONS

- The Effect of Tonoplast Rafts on the DNA Import into Potato
(*Solanum tuberosum*) Tuber Mitochondria
*E. S. Klimenko, I. S. Nesterkina, N. V. Ozolina, V. V. Gurina,
M. V. Koulintchenko, Yu. M. Konstantinov* 396
-
-

УДК 577:543.9

ФОСФОЛИПАЗА А2. МЕТОДЫ МОНИТОРИНГА АКТИВНОСТИ

© 2020 г. А. С. Алексеева^а, И. А. Болдырев^{а, *}^аИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

*e-mail: ivan@lipids.ibch.ru

Поступила в редакцию 07.05.2020 г.

После доработки 13.05.2020 г.

Принята к публикации 14.05.2020 г.

Фосфолипазы А2 (ФЛА2) – белки, обладающие гидролитической активностью в отношении фосфолипидов, они отщепляют жирную кислоту из второго положения (*sn*-2) фосфолипида. Повышенная активность ФЛА2 коррелирует с протеканием в организме множества различных воспалительных процессов. Для целей диагностики и прогнозирования патологических процессов разрабатывают системы детектирования активности ФЛА2. Ключевой компонент всех тест-систем – это субстрат липидной или нелипидной природы, расщепление которого ферментом приводит к появлению анализируемого сигнала. Сами по себе липиды не поглощают свет в видимой области и не флуоресцируют, поэтому для определения активности ФЛА2 разрабатываются субстраты с различными метками. Тест-системы для определения активности ФЛА2 можно условно разделить на три группы в зависимости от того, на какой стадии действия фермента формируется сигнал: 1) системы, основанные на детектировании продуктов гидролиза; 2) системы, основанные на расщеплении флуоресцентно меченных субстратов; 3) системы, основанные на детектировании разрушения мембраны. У каждой из этих групп есть свои требования к строению субстрата. Настоящий обзор сфокусирован на строении субстратов ФЛА2, используемых в системах для определения активности фермента; предложенная классификация позволяет выявить сильные и слабые стороны существующих систем детектирования и будет актуальна при проектировании новых тест-систем.

Ключевые слова: фосфолипаза А2, активность ферментов, липиды, субстраты ФЛА2, флуоресцентные зонды

DOI: 10.31857/S0233475520050035

ВВЕДЕНИЕ

Фосфолипазы А2 (ФЛА2) – обширное семейство белков, обладающих гидролитической активностью в отношении фосфолипидов, они способны селективно отщеплять жирную кислоту из второго положения (*sn*-2) фосфолипида. На сегодняшний день принято выделять шесть семейств ФЛА2: секреторные, цитозольные, Ca²⁺-независимые, ацетилгидролазы фактора активации тромбоцитов (к ним относится липопротеин-ассоциированная ФЛА2), лизосомальные и ФЛА2 жировой ткани. Наиболее представительным является семейство секреторных ФЛА2, которое включает в себя десять групп, каждая из которых имеет ряд подгрупп. Секреторные (внеклеточные) ФЛА2 обнаруживаются во всех тканях млекопитающих, входят в состав ядов змей и насекомых. Благодаря своей каталитической активности, ФЛА2 способны высвобождать жирные кислоты (например, арахидоновую) для циклооксигеназ, липоксигеназ и ферментов цитохрома P450, которые в свою очередь продуцируют раз-

личные медиаторы воспаления, включая лейкотриены, тромбоксаны и простагландины. Наиболее полное описание структурных особенностей, механизмов действия, локализации и роли в организме для каждого типа ФЛА2 можно найти в обзорах [1, 2].

Интерес к изучению эндогенных ФЛА2 вызван большим диапазоном патологий, в развитии которых участвует этот фермент (см. обзоры [2–5]). Выявление роли ФЛА2 позволит создать средства, влияющие на воспалительные процессы в организме, а в идеале управляющие ими [6].

Интерес к изучению экзогенных ФЛА2 (например, из ядов змей) связан с возможностью найти новые терапевтические средства, например, как это произошло с другими компонентами ядов змей [7]. Важной особенностью ФЛА2 является наличие у фермента двух сайтов связывания: один отвечает за связывание фермента с липидной мембраной, а второй – за связывание конкретной молекулы липида и ее гидролиз [8]. Строение каталитического сайта высококонсер-

вативно и для разных представителей ФЛА2 уже достаточно хорошо изучено (например, для всех секреторных ФЛА2 это остатки His и Asp в каталитическом кармане) [1]. Сайт связывания с мембраной, напротив, формируется несколькими десятками аминокислот и различается от фермента к ферменту [9]. Активность и селективность фермента определяется работой обоих сайтов. По своей природе ФЛА2 являются типичными представителями поверхностных белков (т.е. действующих на поверхности, а не в растворе), и это определяет сложную кинетику ферментативного процесса [10].

Как и любой другой белок, ФЛА2 можно обнаружить с помощью антител. Методы ИФА разработаны для представительного набора секреторных ФЛА2 человека [11] и цитозольной ФЛА2 [12]. Основной недостаток методов ИФА для ФЛА2 состоит в том, что само наличие фермента еще не говорит о развитии патологии – важно, чтобы фермент проявлял активность (см., например, сравнительные исследования по определению ФЛА2 антителами и оценкой ее ферментативной активности [13, 14]). В биологических жидкостях присутствует ряд ФЛА2-связывающих белков, которые могут блокировать сайт связывания с мембраной и/или создавать стерические затруднения для связывания липидного субстрата [15].

Тест-системы для определения активности ФЛА2 разрабатываются с 70-х годов. Но только недавно первая тест-система была внедрена в клиническую практику в США для определения активности липопротеин-ассоциированной ФЛА2, которая позволяет прогнозировать течение ишемической болезни сердца [16]. Длительность времени, прошедшего с момента понимания роли ФЛА2 в развитии ишемической болезни сердца до момента внедрения тест-системы в клинику, показывает, насколько сложно оказалось сконструировать такую тест-систему. Тест-системы для детектирования активности других типов ФЛА2, пригодные для клинического применения, разработать пока не удалось. Однако коммерчески доступно несколько тест-систем для лабораторного определения активности секреторных ФЛА2. Отдельное направление исследований – это создание синтетических низкомолекулярных ингибиторов ФЛА2 [1, 17], оценка их эффективности также производится с помощью тест-систем.

Все тест-системы для определения активности ФЛА2 основаны на отслеживании гидролиза липидов. Это сложно сделать потому, что липиды не поглощают в видимой области и не люоресцируют. Кроме того, фермент действует не на индивидуальные молекулы липидов, а на липиды, организованные в бислойные мембраны. Эти два фактора существенно осложняют детектирование гидролиза липидов. Поэтому ключевым компо-

нентом тест-систем для определения активности ФЛА2 являются меченые субстраты. Гидролиз такого субстрата или сразу приводит к появлению аналитического сигнала, или продукты гидролиза являются реакционноспособными соединениями, которые в свою очередь реагируют со вспомогательными веществами, давая новые продукты, которые можно отследить аналитически. Создание субстратов для определения активности ФЛА2 является сложной задачей. Настоящий обзор посвящен строению таких субстратов и предназначен для разработчиков тест-систем для определения ферментативной активности ФЛА2.

ДЕЙСТВИЕ ФЛА2 НА ЛИПИДНЫЙ БИСЛОЙ И ВОЗМОЖНОСТИ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ЕЕ АКТИВНОСТИ

Активность фермента определяется как число молей субстрата, преобразованных ферментом в единицу времени ($\Delta C/\Delta t$). Для определения активности необходимо построить зависимость концентрации субстрата от времени, прошедшего с начала гидролиза. Из одной молекулы фосфолипиды под действием ФЛА2 получается одна молекула лизолипиды и одна молекула жирной кислоты. Активность ФЛА2 можно отслеживать как по уменьшению количества субстрата, так и по появлению одного из продуктов.

ФЛА2 как типичный представитель поверхностных белков не способна гидролизовать липиды в растворе и действует на поверхности липидной мембраны. Для разработки методов детектирования активности ФЛА2 действие фермента на липидный бислой удобно представить в виде трехстадийного процесса, схематически показанного на рис. 1. На первой стадии (i) связанный с мембраной фермент захватывает и гидролизует фосфолипид – высвобождаются продукты реакции: жирная кислота и лизолипид. На второй стадии (ii) продукты гидролиза за счет диффузии распределяются по мембране. На третьей стадии (iii) накопление продуктов гидролиза приводит к повреждению мембраны.

В соответствии со схемой на рис. 1 существует несколько возможностей зарегистрировать активность фермента: 1) отслеживание появления продуктов гидролиза; 2) отслеживание разрушения исходных фосфолипидов; 3) отслеживание разрушения липидной мембраны. Для каждого из этих случаев разработаны свои подходы.

Детектирование активности ФЛА2 по появлению продуктов гидролиза может быть реализовано с использованием природных липидов или липидов с изотопной меткой (рис. 2a). Появляющиеся продукты разделяют хроматографически, а их количество регистрируют. Для построения кинетической кривой необходимо провести несколь-

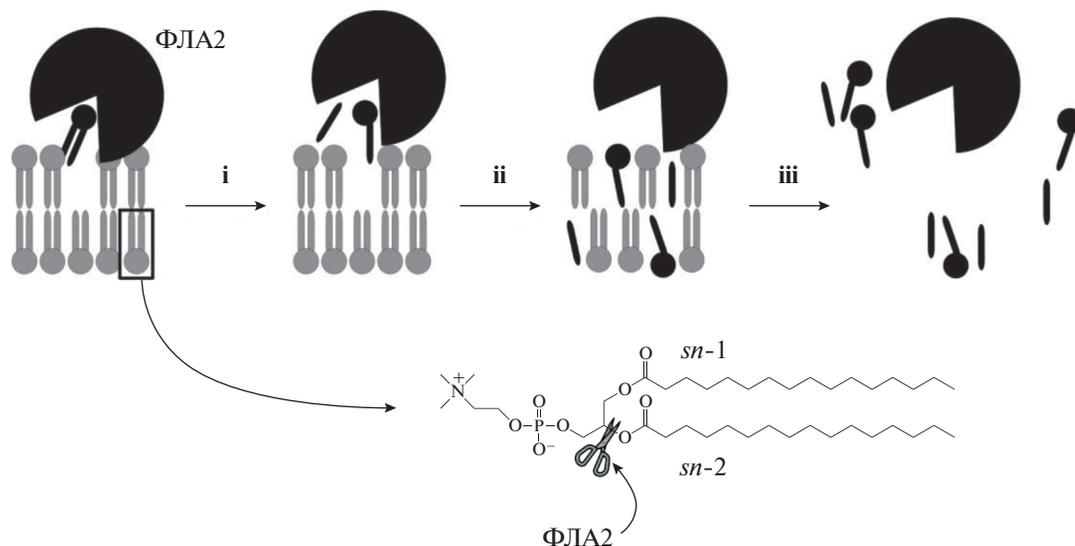


Рис. 1. Схематическое представление действия ФЛА2 на бислой: **i** – захват и гидролиз фосфолипида; **ii** – распределение продуктов гидролиза по мембране; **iii** – разрушение мембраны за счет накопления продуктов гидролиза.

ко последовательных определений с интервалом времени от начала ферментативной реакции. Это единственная схема измерений, позволяющая рассчитать активность фермента напрямую, поскольку регистрируется непосредственно концентрация субстрата или продукта. Скорость изменения этой концентрации и есть активность фермента ($\Delta C/\Delta t$).

Если для детектирования ФЛА2 используются субстраты, которые при гидролизе дают окрашенные продукты, то за появлением таких продуктов можно следить спектрофотометрически без использования хроматографии (рис. 2б). Наблюдаемый сигнал является функцией от концентрации продукта и описывается законом Бугера–Ламберта–Бера. Однако меченый субстрат связывается с ферментом хуже, чем природные липиды, и поэтому скорость его гидролиза может быть меньше.

Кроме того, меченые субстраты используют вместе с природными липидами, которые формируют бислой, липидную матрицу, необходимую для нормального функционирования фермента. Липиды матрицы тоже гидролизуются ФЛА2. Однако сигнал по схеме б (рис. 2б) возникает только при гидролизе меченых субстратов, но не липидов матрицы.

Таким образом, для того чтобы по наблюдаемой активности фермента можно было судить о его реальной активности, необходимо вводить поправку.

На схеме в (рис. 2в) показано детектирование активности ФЛА2 по расщеплению субстратов с флуоресцентной меткой. В этом случае флуоресцентные зонды содержат флуорофор, присоеди-

ненный к одной из гидрофобных цепей липида (обычно в положении *sn-2*) и специфическую группировку, тушитель флуоресценции, прикрепленную к другой гидрофобной цепи или к полярной головке липида. к Тушение флуоресценции обычно происходит по механизму Фёрстеровского резонансного переноса энергии, интенсивность тушения флуоресценции обратно пропорциональна расстоянию между флуорофором и тушителем в шестой степени. До тех пор, пока флуорофор и тушитель находятся в одной молекуле, интенсивность флуоресценции низкая. При гидролизе и последующей диффузии продуктов гидролиза расстояние между флуорофором и тушителем увеличивается, и флуоресцентный сигнал растет. Если флуорофор и тушитель, несмотря на гидролиз, остаются в липидных агрегатах на некотором расстоянии *r* друг от друга, то, если это расстояние невелико, сохраняется остаточное тушение флуоресценции.

Кроме того, при анализе наблюдаемого сигнала следует учитывать, что на его уровень влияют рассеяние света в эмульсиях липосом, зависящее, в свою очередь, от хода гидролиза.

На следующей схеме (рис. 2г) показан способ детектирования активности ФЛА2 по разрушению бислоя или какого-либо другого липидного агрегата. В простом случае используют липосомы, во внутреннем водном объеме которых находится краситель (аналит). При разрушении липосом под влиянием фермента краситель вытекает из внутреннего водного объема липосом в окружающую среду, что приводит к изменению регистрируемого сигнала. При детектировании по схеме г аналит не связан ни с субстратом, ни с

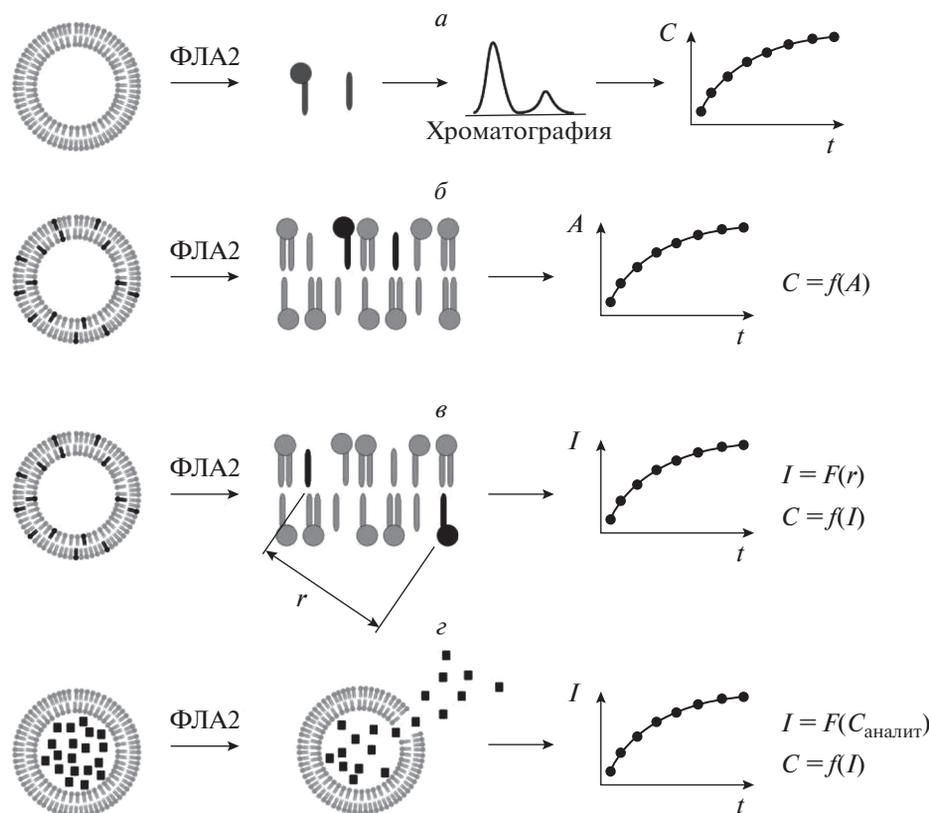


Рис. 2. Схемы детектирования активности ФЛА2. *a* – детектирование продуктов гидролиза с использованием природных липидов или липидов с изотопной меткой; *b* – детектирование активности фермента с использованием субстратов, которые при гидролизе формируют окрашенные продукты; *c* – детектирование активности фермента с использованием субстратов с флуоресцентной меткой; *d* – детектирование активности фермента по разрушению липидных агрегатов.

продуктами гидролиза. Разрушение липосом происходит при накоплении некоторого критического количества продуктов гидролиза.

Таким образом, в большинстве случаев наблюдаемый сигнал зависит от концентрации продуктов гидролиза сложным образом, и требуется внесение поправок. Исключение составляет использование природных липидов или липидов с изотопной меткой. В реальной лабораторной и клинической практике вместо определения всех поправок и выяснения всех зависимостей флуоресцентный сигнал калибруют с помощью стандартных растворов ферментов с известной активностью. Последнюю производят стандартных растворов определяют по схеме *a*. Калибровка позволяет получать надежные результаты для систем с окрашенными и флуоресцентными субстратами (схемы *b* и *c*) и во многих случаях и для коррективы полученных по разрушению липидных агрегатов (схема *d*). Для проектирования новых тест-систем для определения ФЛА2 нужно уменьшать влияние всех посторонних (не связанных с ферментом) факторов на наблюдаемый сигнал.

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЛА2 ПО ПОЯВЛЕНИЮ ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗА

В простых системах, состоящих из единственного фермента и единственного типа липидов, для обнаружения продуктов гидролиза достаточно использовать тонкослойную хроматографию с окрашиванием по методу Васьяковского [18], предложенному еще в 70-х годах. Этот метод окрашивания специфичен относительно остатков фосфата в молекулах липидов. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации фосфатных групп, поэтому относительное количество исходных фосфолипидов и продуктов гидролиза, лизофосфолипидов, можно легко установить (см. пример в работе [19]). Метод не позволяет обнаружить малые количества продукта и вычислить небольшие приращения концентраций. Однако метод прост и применяется для обнаружения самого факта гидролиза.

В сложных многокомпонентных системах, таких как плазма крови, культуральная среда или клеточные лизаты, важно знать, что жирные кислоты и лизолипиды получены именно в ходе гидролиза во время измерения, а не присутствовали в

системе изначально. Другими словами, если ФЛА2 в системе есть и она активна, в системе накапливаются продукты гидролиза. При определении активности фермента их надо отличать от тех продуктов гидролиза, которые образовались в ходе анализа. Для этого нужно или вести одновременный количественный мониторинг и субстратов, и продуктов, или использовать меченые субстраты. В первом случае можно будет вычислить приращение продуктов гидролиза. Во втором случае образуются меченые продукты, которые легко отличить от липидной матрицы и уже имеющих в системе жирных кислот и лизолипидов по специфическому сигналу.

Одновременный мониторинг количеств фосфолипидов и продуктов их гидролиза позволяет вычислить, сколько фосфолипидов гидролизовалось в единицу времени, т.е. сразу определить активность фермента ($\Delta C/\Delta t$). Достаточно долго этот подход было сложно реализовать методически. Однако сейчас, благодаря прогрессу в области масс-спектрометрии и совершенствованием колонок для высокоэффективной жидкостной хроматографии, такой мониторинг уже не является неподъемной задачей. Например, был разработан метод для высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием на масс-спектрометре с электроспрей-ионизацией [20]. Метод позволяет параллельно определять фосфатидилхолин в качестве субстрата ФЛА2, а также его продукты – жирные кислоты и лизофосфатидилхолин [20]. Особенность метода – в использовании колонки с силикагелем с короткоцепной привитой фазой (C5) и детектировании фосфатидилхолина и лизофосфатидилхолина в виде ацетатных аддуктов. Вслед за Шеббом [20] были разработаны и другие методы высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией, позволяющие одновременное детектирование фосфатидилхолина и продуктов его гидролиза ФЛА2 [21]. Метод позволяет получить результаты всего за несколько минут, что означает его высокую эффективность при одновременном мониторинге продуктов гидролиза и исходных липидов.

Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией позволяют вести мониторинг гидролиза липидов ФЛА2, однако этот мониторинг фактически оказывается не непрерывным, а дискретным – время между двумя измерениями равно времени проведения анализа. Поэтому так важно сокращать время проведения анализа, и именно над уменьшением этого времени и работают исследователи.

Можно решить и обратную задачу – использовать фермент для определения липидов. Тану и соавт. с использованием двумерной тонкослойной хроматографии фосфолипаз А1 и А2 удалось разра-

ботать метод определения структуры липидов с установлением мест привязки (*sn-1* или *sn-2*) жирных кислот [22].

Использование меченых субстратов ФЛА2 началось с применения радиоактивно меченных фосфолипидов еще в 70-х–80-х годах. Метод хорошо задокументирован (см., например, [23]). Популярность его была основана на точности радиоактивных методов и на сравнительно легко доступном приборном оснащении. Получаемые данные значительно точнее, чем данные по окрашиванию фосфатных групп методом Васковского.

Радиоактивные субстраты идентичны по своей структуре исходным липидам. Замена одного из атомов углерода ^{12}C в цепи *sn-2* на его изотоп ^{14}C не влияет на способность фермента связывать и гидролизовать субстрат. В этом случае меченый субстрат и липидная матрица представлены однотипной молекулой. Это приводит к существенному преимуществу радиоактивных субстратов – они позволяют измерить активность фермента напрямую. Недостатком метода является сложность получения разрешения на работу с радиоактивными веществами. По мере того, как становились доступными другие методы определения активности ФЛА2, использование радиоактивных методов становилось все более редким.

Непрерывное детектирование (без промежуточной хроматографии) возможно при использовании спектрального оборудования, например спектрофотометра. Однако молекулы фосфолипидов не поглощают свет в видимой области спектра. Поэтому развилось направление исследований по химической модификации липидов, целью которого было предложить такие субстраты ФЛА2, которые бы несли на себе репортерные группы, хромофоры, которые можно было бы детектировать с помощью спектрофотометра.

Поскольку суммарная концентрация репортерных групп в системе в ходе гидролиза меняться не может, то под действием фермента должно происходить такое изменение, которое бы приводило к изменению регистрируемого сигнала. При расщеплении сложноэфирной связи под действием фермента должна меняться окраска исследуемого раствора образца. Были предприняты попытки [24, 25] найти вещества нелипидной природы, которые бы гидролизировались ФЛА2, и полученные фрагменты имели бы отличный от исходного вещества спектр поглощения света.

Таким веществом является, например, 4-нитро-3-октаноилокси-бензойная кислота **4** (рис. 3) [24]. Это вещество поглощает в УФ-диапазоне, но при его гидролизе высвобождается нитрофенольное производное **5** (рис. 3), которое имеет максимум поглощения уже в видимой области (при 425 нм). По мере протекания гидролиза наблюдаются появление и усиление желтой окраски.

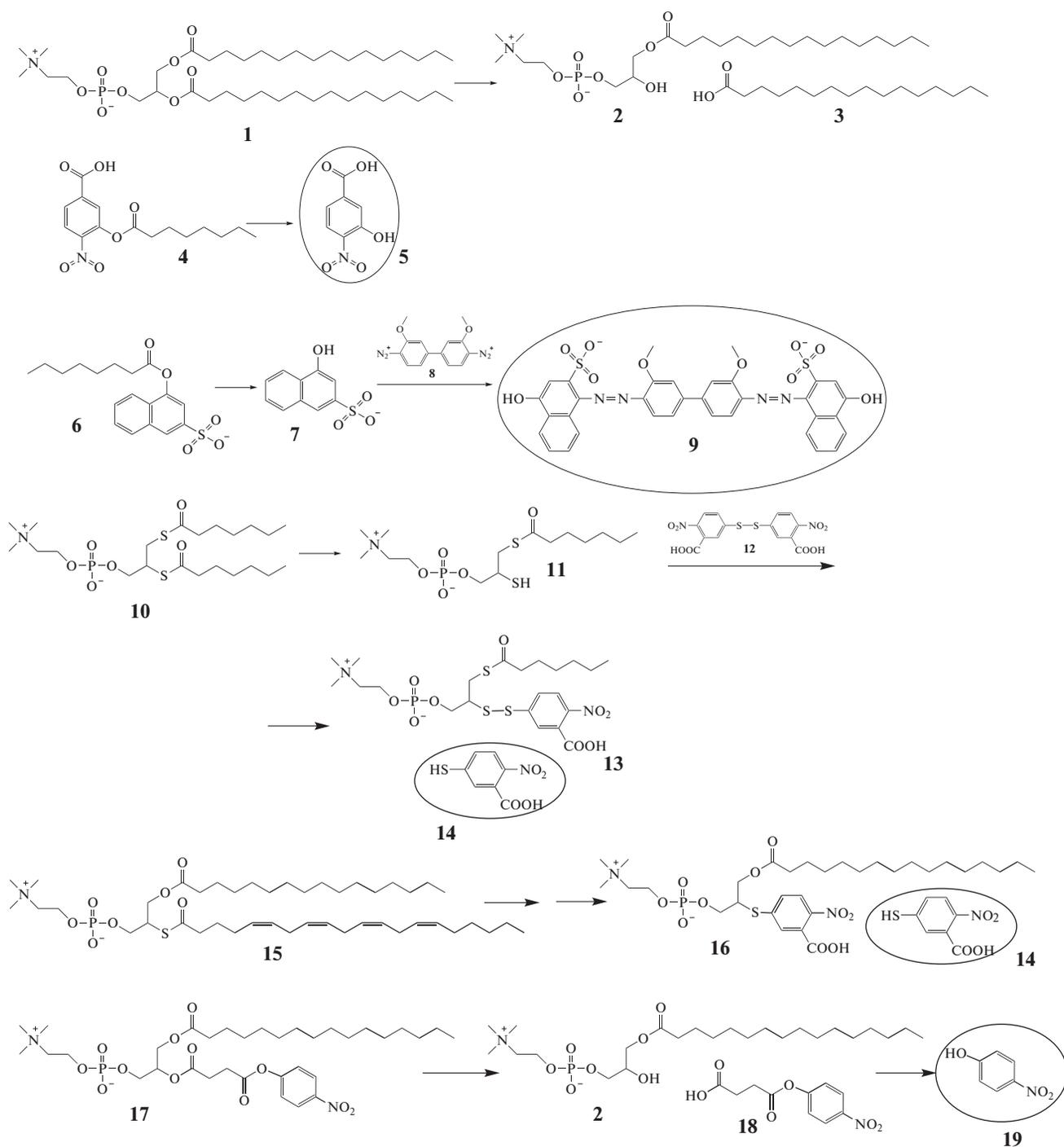


Рис. 3 Детектирование активности ФЛА2 по появлению продуктов гидролиза. Фосфатидилхолин **1** и продукты его гидролиза ферментом: лизофосфатидилхолин **2** и жирная кислота **3**. Цветные (детектируемые) продукты гидролиза обведены. Остальные пояснения в тексте.

Похожим субстратом является 1-октаоилок-синафталин-3-сульфокислота **6** [25], которая, как было установлено авторами, хорошо гидролизуется ФЛА2. Продуктом ее гидролиза является 1-нафтол-3-сульфокислота **7**, которая реагирует с имеющейся в растворе солью диазония **8** (реак-

ция азосочетания) с образованием красно-пурпурного азокрасителя **9** (рис. 3). При этом изменение спектра поглощения исследуемого раствора происходит в ходе дополнительной реакции.

Большую схожесть с природными фосфолипидами имеют тио-производные **10** и **15** (рис. 3).

Фактически, от природных фосфолипидов их отличает замена одного атома — кислород в сложноэфирной связи заменен на атом серы. Фосфолипаза А2 способна гидролизовать такую связь, а высвобождающиеся тио-производные реагируют с DTNB (5,5'-дитио-бис-(2-нитро-бензойная кислота)), **12** с образованием окрашенного тионитропроизводного **14**. Соединения **10** и **15** служат субстратами секреторной и цитозольной ФЛА2 соответственно. Тио-производное **15** несет остаток арахидоновой кислоты, что является необходимым условием для успешного детектирования активности цитозольной ФЛА2, поскольку цитозольные ФЛА2 — единственные представители суперсемейства ФЛА2, которые проявляют специфичность к остатку арахидоновой кислоты.

Еще один липидоподобный субстрат — 1-миристоил-2-(4-нитрофенилсукцинил)-фосфатидилхолин **17**. Этот субстрат представляет собой фосфатидилхолин, у которого вместо жирной кислоты во втором положении находится производное янтарной кислоты и нитрофенола (рис. 3). Ферментативный гидролиз в *sn*-2 положении приводит к образованию монозамещенного производного янтарной кислоты (*n*-нитрофенилсукцинат, **18**), который в свою очередь самопроизвольно гидролизуетсся с образованием *n*-нитрофенола **19**. Последний дает яркую желтую окраску (пик поглощения 405 нм). Активность фермента определяется спектрофотометрически по окраске раствора. Система разработана для количественного определения липопротеин-ассоциированной ФЛА2 в плазме и сыворотке крови, которая позволяет прогнозировать течение ишемической болезни сердца. Воспроизводимость тест-системы проверялась как силами компании разработчика [26], так и исследовательскими организациями [16]. В настоящее время это единственная дошедшая до клинического применения тест-система.

Указанные выше субстраты ФЛА2 не являются природными фосфолипидами. Тио-производные **10** и **15** содержат химическую модификацию в чувствительном месте — там, где происходит разрыв связи под действием фермента, а субстрат **17** содержит хромофорную группу достаточно близко к активному центру фермента. Как следствие, активность фермента относительно этих субстратов отличается от его активности в отношении фосфолипидов. Поэтому в лабораторной и клинической практике необходимо использовать образцы сравнения — чистые образцы фермента с известной активностью. При этом калибровочные кривые необходимо воспроизводить для каждого нового образца, что, несомненно, является ограничением. Преимущество же состоит в том, что измеряемый сигнал — интенсивность поглощения света на определенной длине волны — прямо пропорционален концентрации продукта, что делает определение активности ФЛА2 про-

стым. Альтернативой субстратам ФЛА2 с хромофорными репортерными группами, меняющими цвет, являются субстраты с флуоресцентными метками. Однако их принцип действия другой.

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЛА2 ПО РАСЩЕПЛЕНИЮ СУБСТРАТА

Метод определения активности ФЛА2 по расщеплению субстрата основан на том, что продукты гидролиза, более не связанные в одну молекулу, диффундируют в липидной матрице удаляясь друг от друга. Это приводит к изменению сигнала. Флуоресцентные зонды содержат флуорофор, присоединенный к одной из гидрофобных цепей липида, и тушитель флуоресценции, прикрепленный к другой гидрофобной цепи или к полярной головке липида. До тех пор, пока флуорофор и тушитель находятся в одной молекуле, флуоресценция оказывается низкой. При гидролизе и последующей диффузии продуктов гидролиза расстояние между флуорофором и тушителем увеличивается, а флуоресцентный сигнал растет.

Фактически при таком подходе регистрируют не продукты гидролиза, а сам факт гидролиза: что остатки жирной кислоты не составляют одну молекулу, а разделены пространственно. Если продукты гидролиза не расходятся в пространстве и остаются достаточно близко друг к другу, флуоресцентный сигнал будет занижен.

Важная роль диффузии продуктов гидролиза в формировании сигнала определяет необходимость использования липидной матрицы. Она формирует среду, в которой диффундируют продукты гидролиза.

При разработке субстратов с флуоресцентной меткой необходимо учитывать, что флуорофоры достаточно объемистые группировки. Они могут препятствовать связыванию ферментом, и гидролиз таких молекул может идти слишком медленно или не идти вовсе. Исходя из структуры каталитического сайта фермента предполагается, что молекула субстрата должна содержать флуорофор и тушитель на конце гидрофобной цепи не ближе, чем 10 атомов углерода от глицеринового остатка липида [27], т.е. далеко от каталитического сайта фермента.

Ниже приводится несколько примеров субстратов ФЛА2 для определения ее активности по изменению сигнала флуоресценции (рис. 4). При достаточно большом разнообразии флуорофоров и тушителей липидная часть у этих молекул остается неизменной.

В лабораторной практике достаточно широко применяются коммерчески доступные липидные производные с флуорофором BODIPY на конце жирной цепи и динитрофенильным тушителем, присоединенным к полярной головке липида (**20**)

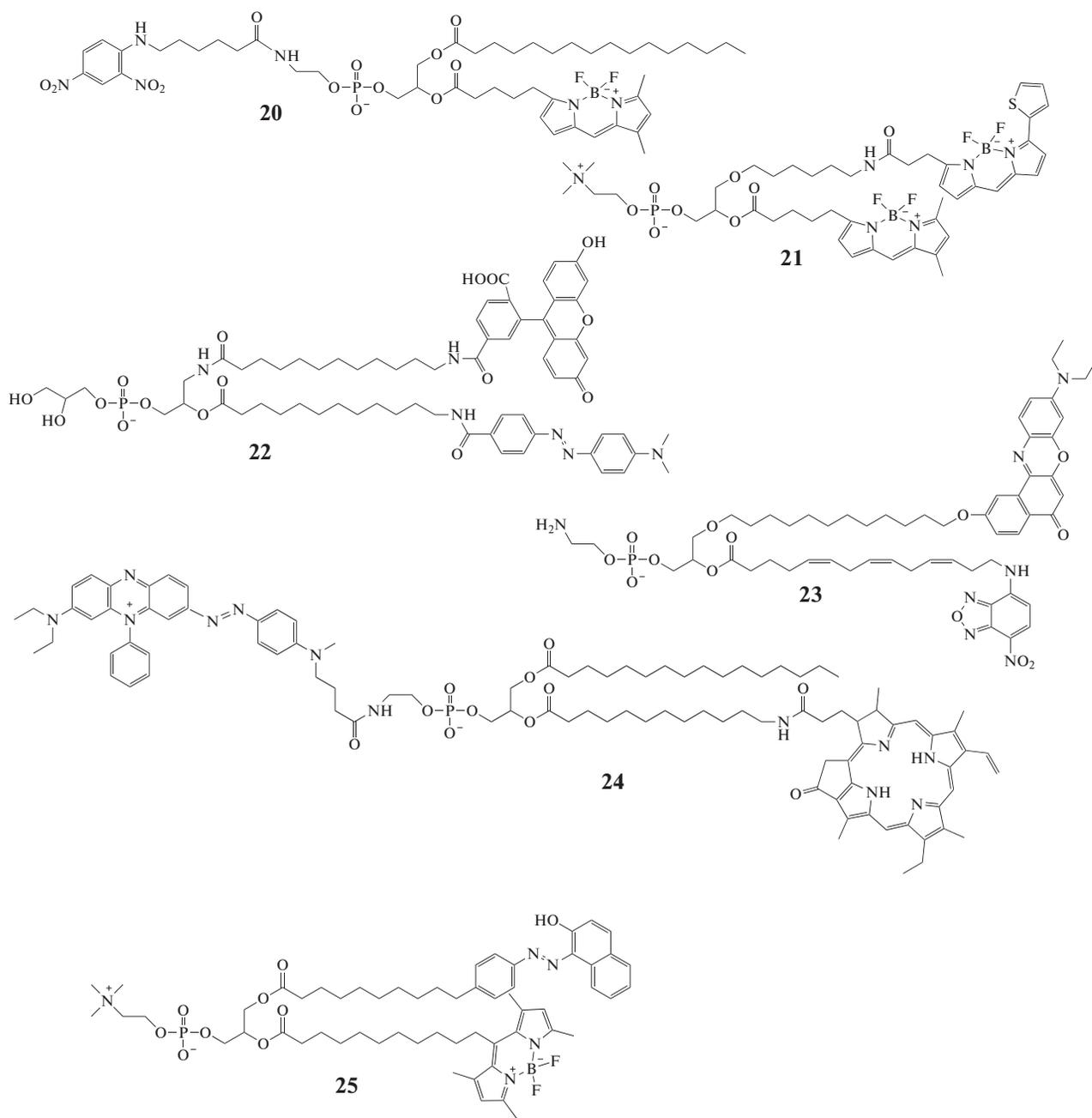


Рис. 4. Флуоресцентные субстраты для определения активности ФЛА2, несущие флуорофор и специфический тушитель флуоресценции.

(рис. 4) (пример применения см. в [28]), а также флуоресцентно меченный зонд Red/Green BODIPY PC-A2 (**21**). Последний предназначен для работы с клетками и клеточными лизатами. Матрицу составляют фосфолипиды – смесь диолеилфосфатидилхолина и диолеилфосфатидилглицерина (примеры применения [29, 30]).

Абе с соавт. предложили фосфатидилглицерин с флуоресцеином в качестве флуорофора и дабсиллом в качестве тушителя (**22**) [31], длина гидрофобных цепей была 12 атомов углерода. При этом

лучшим оказался зонд с флуоресцеином по *sn*-1 положению, а с дабсиллом по *sn*-2 положению (именно эта структура приведена рис. 3).

Вичман с соавт. предложили серию флуоресцентных липидных зондов, у которых флуорофор находился на конце длинной цепи, причем сама цепь напоминала арахидоновую кислоту (**23**) [32].

Попов с соавт. [33] предложили зонды, в которых в качестве метки использовалось производное феофорбида, испускающее свет в ближней

инфракрасной зоне и присоединенное к концу гидрофобной цепи длиной 6 или 12 атомов углерода (24). В качестве тушителя флуоресценции использовалось диазопроизводное — так называемый черный тушитель. Они обнаружили, что производное с короткой цепью (6 атомов) не гидролизовалось ФЛА2, а производное с длинной цепью успешно гидролизовалось (рис. 4).

Вариант Алексеевой и соавт. [27] представляет собой фосфатидилхолин с флуорофором BODIPY и специфическим тушителем его флуоресценции — красителем судан III. Оба прикреплены на концах длинных жирных цепей (25).

Можно утверждать, что за годы разработок исследователям удалось спроектировать такие субстраты ФЛА2, которые, неся на себе громоздкие флуорофоры и тушители, успешно гидролизуются ферментом. Вместе с правильно подобранными матрицами и использованием стандартных образцов ферментов они дают хорошие результаты.

Главный недостаток систем с флуорофорами и тушителями — это то, что наблюдаемый сигнал (интенсивность флуоресценции) и концентрация продуктов гидролиза зависят друг от друга нелинейно. Влияние побочных процессов проявляется особенно сильно в биологических образцах, таких как плазма крови и лизаты клеток. В последних находится множество компонентов, способных влиять на липидную матрицу и, как следствие, на распределение меток в липидном бислое. Необходимо использовать дополнительные способы коррекции. Примером учета побочных процессов может служить работа Алексеевой и соавт. [27]. Для описания кинетики наблюдаемого сигнала флуоресценции они предложили трехстадийную модель, которая включает исходный субстрат в матрице, негидролизованный субстрат вне матрицы и продукты гидролиза. Решение этой модели позволяет вычислить активность фермента в плазме крови. Это достижение, однако, сложно перенести в широкую практику из-за относительно сложного математического аппарата по сравнению с прямым детектированием продуктов гидролиза.

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЛА2 ПО ПОВРЕЖДЕНИЮ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ

Гидролиз липидов под действием ФЛА2 и накопление в липидном бислое продуктов гидролиза — лизолипидов и жирных кислот — вызывает искажение упаковки мембраны, а затем и полное ее разрушение. Эти изменения можно зарегистрировать и оценивать по ним активность ФЛА2.

Отслеживание изменения светорассеяния исходной дисперсии — один из вариантов такого подхода. Интенсивность рассеянного света зависит от размера частиц. Стабильные липосомы

имеют размер не менее 50 нм и могут быть приготовлены методом экструзии со сравнительно узким распределением по размеру. При действии ФЛА2 на липосомы образуются лизолипиды, которые не способны образовывать бислой, а значит, и формировать липосомы. Сами по себе лизолипиды образуют мицеллы, размер которых составляет всего несколько нанометров. Изменение размеров липидных частиц приводит к изменению интенсивности светорассеяния, которое можно отслеживать и судить по нему об активности ФЛА2 [34]. Однако метод требует значительных количеств липидов и фермента.

Еще один вариант — это использование жидкокристаллических сенсоров, где выделяющиеся в ходе работы ФЛА2 продукты гидролиза искажают упаковку молекул жидких кристаллов. Такие сенсоры устроены следующим образом: слой жидких кристаллов, закрепленный на микросетке, находится над слоем липосом. Если в слое липосом оказывается фермент (сенсор может быть настроен и на проточную работу) и происходит гидролиз липидов, то высвобождающиеся жирные кислоты и лизолипиды мигрируют из липидной фазы и встраиваются в слой жидких кристаллов. Это изменяет картину поляризации света, который проходит сквозь слой жидких кристаллов [35]. Альтернативно липиды могут изначально находиться внутри слоя жидких кристаллов, а их гидролиз ФЛА2 до лизолипидов меняет упаковку жидких кристаллов. Детектирование также осуществляется за счет изменения поляризации света [36].

Более простыми и одновременно чувствительными к разрушению бислоя являются методы, основанные на флуоресцентных красителях. В них используются красители, встроенные в липидную мембрану, или красители, находящиеся во внутреннем водном объеме. Системы спроектированы так, чтобы повреждение мембраны вызывало изменение сигнала флуоресценции.

Хуанг и соавт. [37] использовали флуоресцентный краситель ANS (анилинонафталинсульфокислота) встроенный в липидный бислой. Флуоресценция этого красителя зависит от полярности окружения — при переходе от неполярного к полярному окружению она падает. Пока ANS встроен в мембрану, сигнал флуоресценции остается высоким. При разрушении мембраны локальное микроокружение метки становится более полярным — флуоресценция падает. Флуоресценция ANS меняется при его сорбции на альбумине и на множестве других белков. Поэтому для определения активности ФЛА2 в биологических образцах этот метод непригоден.

Для измерения активности фосфолипазы А2 в присутствии альбумина была разработана тест-система с использованием фосфолипидов, несущих

щих в *sn*-2-положении 10-пиренилдеканойный остаток [38]. В водной среде такие фосфолипиды образуют везикулы с минимальной флуоресценцией мономера (за счет эксимеризации пиренила). Высвобождающаяся в результате ферментативного расщепления 10-пиренилдекановая кислота «растворяется» в реакционной среде только в присутствии альбумина, который связывает жирные кислоты с высоким сродством. При этом наблюдается усиление флуоресценции пиренильного мономера. В этой системе анализ, пиренилдекановая кислота, является продуктом гидролиза. Субстрат, пиренил-меченый фосфатидилхолин, отличается от субстратов с флуорофором и тушителем тем, что тушение флуоресценции происходит в ходе межмолекулярного взаимодействия, а не в одной молекуле. Два остатка пирена из разных молекул взаимодействуют, образуя эксимер (флуоресценция мономера оказывается затухнутой). Гидролиз приводит к разрушению агрегатов из пиренил-меченого фосфатидилхолина, одновременно исчезает среда, в которой могли образовываться эксимеры. Из-за своей простоты эта тест-система нашла широкое применение в лабораторной практике при определении активности образцов фермента, выделенных из разных организмов. Примеры применения [39, 40].

Табей и соавт. [41] использовали иммобилизованные на подложке флуоресцентно меченные липосомы. В поле зрения конфокального микроскопа эти липосомы представляли собой яркие точки. Под действием ФЛА2 липосомы разрушаются, и продукты гидролиза мигрируют из иммобилизованной липосомы в окружающую среду. Интенсивность флуоресценции (яркость точки, представляющей собой липосому) падает. По падению яркости можно вычислить активность фермента. Авторы предполагают, что имеет место взаимодействие одной молекулы фермента с липосомой [41].

Чаще встречается ситуация, когда флуоресценция красителя, встроенного в мембрану, специально затухает (рядом находится тушитель флуоресценции). При разрушении мембраны флуорофор и тушитель расходятся в пространстве, и флуоресценция растет. По такому принципу работает пара липидных зондов ТМВ-РС/ВСНВ-РС [42, 43]. Важно, что в этой системе флуорофор и тушитель находятся в разных молекулах. Эта система позволяет оценить масштаб повреждения липидной мембраны. С ее помощью было обнаружено негидролитическое действие гетеродимерных фосфолипаз из секрета ядовитой железы гадюки Никольского [19].

Нарушение целостности липосом можно отслеживать по вытеканию красителя из внутреннего водного объема липосом. Классический пример — липосомы, нагруженные кальцином.

Этот флуоресцентный краситель внутри липосом находится в высокой концентрации. Из-за эффекта внутреннего фильтра флуоресценция концентрированных растворов “затухает”. При разрушении липосом краситель вытекает во внешний водный объем, происходит его разбавление, и уровень флуоресцентного сигнала растет. Этот прием нашел применение в многочисленных исследованиях устойчивости липидного бислоя (см., например, [44]). В случае ФЛА2 он был реализован как метод для высокоэффективной жидкостной хроматографии [45]. Липосомы с кальцином иммобилизованы на поверхности частиц носителя для хроматографии. При гидролизе высвобождается краситель, и его флуоресценцию регистрируют в системе для высокоэффективной жидкостной хроматографии. Эту систему затем развили, создав на ее основе систему детектирования полихлорированных бифенолов. В этом случае ФЛА2 выступает в роли усилителя сигнала [46, 47].

Чен с соавт. нагружали липосомы тринитрофенолом и затем эмульсию липосом наносили на графеновую подложку. При действии ФЛА2 липосомы разрушаются, и высвобождается тринитрофенол, который сорбируется на графене и меняет его проводимость [48].

Часто вместо липосом используются составные частицы из липидов и каких-либо наночастиц. Например, Ли с соавт. использовали составные наночастицы из квантовых точек, NBD-меченого фосфатидилхолина и гидрогенизированного соевого фосфатидилхолина [49]. Изначально флуоресценция NBD затухает квантовыми точками. После того как фермент гидролизует липиды, частицы разрушаются, NBD высвобождается в раствор, и появляется сигнал флуоресценции. Чен с соавт. использовали золотые наночастицы, покрытые дипальмитойлфосфатидилхолином. При их гидролизе оболочка разрушается, а частицы агрегируют, что меняет спектр поглощения [50]. Гуо с соавт. [51] создали наночастицы на основе гадолиния с перфтор-15-корона-5 и оболочкой из фосфолипидов. Сигнал (время T2 19F MRI) затухает в присутствии гадолиния. При разрушении липидной оболочки ферментом наночастицы распадаются — появляется сигнал. Метод детектирования — магнитный резонанс [51].

Все системы детектирования ФЛА2 по разрушению липидного слоя обладают одним и тем же недостатком. Наблюдаемый сигнал зависит от протекания гидролиза не напрямую, а через стадии накопления продуктов и разрушения липидного слоя. Обе эти стадии могут зависеть от протекания сторонних процессов, таких, например, как сорбция альбумина или других белков, если речь идет о работе со многокомпонентными средами. Иными словами, сторонние процессы могут слишком сильно влиять на сигнал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение участия фосфолипазы А2 во множестве патологических процессов, в первую очередь воспалительных, привлекает все больше внимания исследователей. Особое значение имеет детектирование активности ФЛА2 в биологических средах — культуральной жидкости, лизатах клеток, плазме и сыворотки крови. Фосфолипазы А2 входят в состав ядов разнообразных организмов и исследование активности фосфолипаз А2 из новых источников является актуальной и сложной задачей.

Начиная с 70-х годов и до настоящего времени продолжают разработки системы для определения активности ФЛА2. Однако создание таких систем для биологических образцов оказалась гораздо более сложной задачей. На сегодняшний день в клинической диагностике имеется только одна тест-система по определению липопротеин-ассоциированной ФЛА2, позволяющая работать с плазмой и сывороткой крови. Методы, основанные на детектировании продуктов гидролиза и на расщеплении флуоресцентно меченных липидов оказываются более приспособленными для отслеживания активности ФЛА2 в биологических образцах. Методы, основанные на детектировании продуктов гидролиза, проще в применении. Методы, основанные на детектировании расщепления флуоресцентно меченных липидов, требуют сложной математической обработки экспериментальных данных. Методы, основанные на детектировании разрушения мембраны, еще более сложны для применения, потому что аналит не связан с фактом расщепления липидных молекул.

Дальнейшее развитие методов детектирования активности ФЛА2 для клинических применений должно учитывать разницу между строением меченого субстрата и природными липидами так, чтобы скорость гидролиза новых субстратов была близкой к скорости гидролиза природных липидов. Для этого сами субстраты должны быть структурно близкими к липидам, а метки должны располагаться как можно дальше от каталитического сайта связывания фермента. Будущие тест-системы для ФЛА2 должны также учитывать протекание влияющих на сигнал побочных процессов, таких как разрушение липидной матрицы под действием белков плазмы крови. Накопленные к настоящему моменту знания о структуре субстратов и работе тест-систем на их основе уже позволяют разрабатывать такие системы, которые бы соответствовали всем этим требованиям.

Обзор подготовлен в рамках гранта Российского научного фонда №19-75-00101.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dennis E.A., Cao J., Hsu Y.-H., Magrioti V., Kokotos G. 2011. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* **111** (10), 6130–6185. <https://doi.org/10.1021/cr200085w>
2. Vasquez A. M., Mouchlis V.D., Dennis E.A. 2018. Review of four major distinct types of human phospholipase A2. *Adv. Biol. Regul.* **67** (3), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.10.009>
3. Sofogianni A., Alkagiet S., Tziomalos K. 2018. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and coronary heart disease. *Curr. Pharm. Des.* **24** (3), 291–296. <https://doi.org/10.2174/138161282466618011110550>
4. Talmud P.J., Holmes M.V. 2015. Deciphering the causal role of sPLA2s and Lp-PLA2 in coronary heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35** (11), 2281–2289. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305234>
5. Dore E., Boilard E. 2019. Roles of secreted phospholipase A 2 group IIA in inflammation and host defense. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids.* **1864** (6), 789–802. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.017>
6. Nikolaou A., Kokotou M.G., Vasilakaki S., Kokotos G. 2019. Small-molecule inhibitors as potential therapeutics and as tools to understand the role of phospholipases A2. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids.* **1864** (6), 941–956. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.009>
7. Zambelli V.O., Picolo G., Fernandes C.A.H., Fontes M.R.M., Cury Y. 2017. Secreted phospholipases A₂ from animal venoms in pain and analgesia. *Toxins.* **9** (12), 406. <https://doi.org/10.3390/toxins9120406>
8. Scott D., White S., Otwinowski Z., Yuan W., Gelb M., Sigler P. 1990. Interfacial catalysis: The mechanism of phospholipase A2. *Science.* **250** (4987), 1541–1546. <https://doi.org/10.1126/science.2274785>
9. Winget J.M., Pan Y.H., Bahnsen B.J. 2006. The interfacial binding surface of phospholipase A2s. *Biochim. Biophys. Acta.* **1761** (11), 1260–1269. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.08.002>
10. Berg O.G., Gelb M.H., Tsai M.-D., Jain M.K. 2001. Interfacial enzymology: The secreted phospholipase A2-paradigm. *Chem. Rev.* **101** (9), 2613–2654. <https://doi.org/10.1021/cr990139w>
11. Nevalainen T.J., Eerola L.I., Rintala E., Laine V.J. , Lambeau G., Gelb M.H. 2005. Time-resolved fluoroimmunoassays of the complete set of secreted phospholipases A2 in human serum. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids.* **1733** (2–3), 210–223. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.12.012>
12. Macdonald D.J., Boyle R. M., Glen A.C.A., Leslie C. C., Glen A.I.M., Horrobin D.F. 2015. The development of an ELISA for group IVA phospholipase A2 in human red blood cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* **94**, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.11.003>
13. Topbas C., Swick A., Razavi M., Anderson N.L., Pearson T.W., Bystrom C. 2018. Measurement of lipopro-

- tein-associated phospholipase A2 by use of 3 different methods: Exploration of discordance between ELISA and activity assays. *Clin. Chem.* **64** (4), 697–704. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.279752>
14. Zhuo S., Wolfert R.L., Yuan C. 2017. Biochemical differences in the mass and activity tests of lipoprotein-associated phospholipase A 2 explain the discordance in results between the two assay methods. *Clin. Biochem.* **50** (18), 1209–1215. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.08.019>
 15. Šribar J., Križaj I. 2011. Secreted phospholipases A2 – Not just enzymes. *Acta Chimica Slovenica*, **58** (4), 678–688.
 16. Donato L. J., Meeusen J. W., Callanan H., Saenger A. K., Jaffe A. S. 2016. Advantages of the lipoprotein-associated phospholipase A2 activity assay. *Clin. Biochem.* **49** (1–2), 172–175. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.09.002>
 17. Ong W.Y., Farooqui T., Kokotos G., Farooqui A.A. 2015. Synthetic and natural inhibitors of phospholipases A2: Their importance for understanding and treatment of neurological disorders. *ACS Chem. Neurosci.* **6** (6), 814–831. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00073>
 18. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. 1975. A universal reagent for phospholipid analysis. *J. Chromatography A.* **114** (1), 129–141. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85249-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85249-8)
 19. Alekseeva A.S., Tretiakova D.S., Chernikov V.P., Utkin Y.N., Molotkovsky J.G., Vodovozova E.L., Boldyrev I.A. 2017. Heterodimeric V. nikolskii phospholipases A2 induce aggregation of the lipid bilayer. *Toxicol.* **133**, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2017.05.015>
 20. Schebb N.H., Falck D., Faber H., Hein E.-M., Karst U., Hayen H. 2009. Fast method for monitoring phospholipase A2 activity by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatography A.* **1216** (27), 5249–5255. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.020>
 21. Stephenson D.J., MacKnight H.P., Hoeflerlin L.A., Park M.A., Allegood J.C., Cardona C.L., Chalfant C.E. 2019. A rapid and adaptable lipidomics method for quantitative UPLC-mass spectrometric analysis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine in vitro, and in cells. *Anal. Methods.* **11** (13), 1765–1776. <https://doi.org/10.1039/C9AY00052F>
 22. Tan G., Tian Y., Addy M., Cheng Y., Xie Q., Zhang B., Liu Y., Chen P., Ruan R. 2017. Structural analysis of phosphatidylcholine using a thin layer chromatography-based method. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **119** (7), 1600282. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600282>
 23. Leslie C.C., Gelb M.H. 2004. Assaying phospholipase A2 activity. *Methods Mol. Biol. (Clifton, N.J.)*. **284**, 229–242.
 24. Petrovic N., Grove C., Langton P.E., Misso N.L.A., Thompson P.J. 2001. A simple assay for a human serum phospholipase A2 that is associated with high-density lipoproteins. *J. Lipid Research.* **42** (10), 1706–1713.
 25. Eba C., Okano A., Nakano H., Iwasaki Y. 2014. A chromogenic substrate for solid-phase detection of phospholipase A2. *Analyt. Biochem.* **447** (1), 43–45. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.11.007>
 26. Cerelli M.J., Grimm K., Duan X., Mulberg E., Jalilie M., Sekella P., Payes M., Cox H., Blick K.E., Fang K.C., Zychlinsky E. 2016. Evaluation of recombinant enzyme calibration to harmonize lipoprotein-associated phospholipase A 2 activity results between instruments. *Clin. Biochem.* **49** (6), 480–485. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.11.018>
 27. Alekseeva A.S., Korotaeva A.A., Samoilova E.V., Volynsky P.E., Vodovozova E.L., Boldyrev I.A. 2014. Secretory phospholipase A2 activity in blood serum: The challenge to sense. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **454** (1), 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.069>
 28. Benson M.A., Schmalzer K.M., Frank D.W. 2010. A sensitive fluorescence-based assay for the detection of ExoU-mediated PLA2 activity. *Clinica Chimica Acta.* **411** (3–4), 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.10.025>
 29. Currò M., Ferlazzo N., Risitano R., Condello S., Vecchio M., Caccamo D., Ientile R. 2014. Transglutaminase 2 and phospholipase A2 interactions in the inflammatory response in human Thp-1 monocytes. *Amino Acids.* **46** (3), 759–766. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1569-y>
 30. Machado-Aranda D., Wang Z., Yu B., Suresh M.V., Notter R.H., Raghavendran K. 2013. Increased phospholipase A2 and lyso-phosphatidylcholine levels are associated with surfactant dysfunction in lung contusion injury in mice. *Surgery.* **153** (1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2012.05.043>
 31. Abe A., Rzepecki P.W., Shayman J.A. 2013. A fluorogenic phospholipid for the detection of lysosomal phospholipase A2 activity. *Analyt. Biochem.* **434** (1), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.11.004>
 32. Wichmann O., Gelb M.H., Schultz C. 2007. Probing phospholipase A2 with fluorescent phospholipid substrates. *ChemBioChem.* **8** (13), 1555–1569. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600462>
 33. Popov A.V., Mawn T.M., Kim S., Zheng G., Delikatny E.J. 2010. Design and synthesis of phospholipase C and A 2 -activatable near-infrared fluorescent smart probes. *Bioconjug. Chem.* **21** (10), 1724–1727. <https://doi.org/10.1021/bc100271v>
 34. Maity G., Bhattacharyya D. 2005. Assay of snake venom phospholipase A2 using scattering mode of a spectrofluorimeter. *Curr. Sci.* **89** (6), 1004–1008.
 35. Horton K.L., Stewart K.M., Fonseca S.B., Guo Q., Kelley S.O. 2008. Mitochondria-penetrating peptides. *Chem. Biol.* **15** (4), 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.03.015>
 36. Liu Y., Cheng D., Lin I.-H., Abbott N.L., Jiang H. 2012. Microfluidic sensing devices employing in situ formed liquid crystal thin film for detection of biochemical interactions. *Lab on a Chip.* **12** (19), 3746–3753. <https://doi.org/10.1039/c2lc40462a>
 37. Huang C., Zhou L., Liu Y., Lai L. 2006. A continuous fluorescence assay for phospholipase A2 with non-tagged lipid. *Analyt. Biochem.* **351** (1), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.021>

38. Radvanyi F., Jordan L., Russo-Marie F., Bon C. 1989. A sensitive and continuous fluorometric assay for phospholipase A2 using pyrene-labeled phospholipids in the presence of serum albumin. *Analyt. Biochem.* **177** (1), 103–109.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90022-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90022-5)
39. Mallat Z., Steg P.G., Benessiano J., Tanguy M.L., Fox K.A., Collet J.P., Dabbous O.H., Henry P., Caruthers K.F., Dauphin A., Arguelles C.S., Masliah J., Hugel B., Montalescot G., Freyssinet J., Asselain B., Tedgui A. 2005. Circulating secretory phospholipase A2 activity predicts recurrent events in patients with severe acute coronary syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **46** (7), 1249–1257.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.06.056>
40. Mallat Z., Benessiano J., Simon T., Ederhy S., Sebella-Arguelles C., Cohen A., Huart V., Wareham N., Luben R., Khaw K., Tedgui A., Boekholdt M. 2007. Circulating secretory phospholipase A2 activity and risk of incident coronary events in healthy men and women: The EPIC-NORFOLK study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* **27** (5), 1177–1183.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.139352>
41. Tabaei S.R., Rabe M., Zetterberg H., Zhdanov V.P., Höök F. 2013. single lipid vesicle assay for characterizing single-enzyme kinetics of phospholipid hydrolysis in a complex biological fluid. *J. Amer. Chem. Soc.* **135** (38), 14151–14158.
<https://doi.org/10.1021/ja4046313>
42. Alekseeva A.S., Tretiakova D.S., Melnikova D.N., Molotkovsky U.G., Boldyrev I.A. 2016. Novel fluorescent membrane probe 2,3,5,6-bis(cyclohexyl)-BODIPY-labeled phosphatidylcholine. *Russ. J. Bioorgan. Chem.* **42** (3), 305–309.
<https://doi.org/10.1134/S1068162016030031>
43. Tretiakova D.S., Alekseeva A.S., Galimzyanov T.R., Boldyrev A.M., Chernyadyev A.Y., Ermakov Y.A., Batishchev O.V., Vodovozova E.L., Boldyrev I.A. 2018. Lateral stress profile and fluorescent lipid probes. FRET pair of probes that introduces minimal distortions into lipid packing. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1860** (11), 2337–2347.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.020>
44. Tretiakova D., Onishchenko N., Boldyrev I., Mikhalyov I., Tuzikov A., Bovin N., Evtushenko E., Vodovozova E. 2018. Influence of stabilizing components on the integrity of antitumor liposomes loaded with lipophilic prodrug in the bilayer. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **166**, 45–53.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.02.061>
45. Liu X.-Y., Nakamura C., Yang Q., Miyake J. 2001. Phospholipase A2-catalyzed membrane leakage studied by immobilized liposome chromatography with online fluorescent detection. *Analyt. Biochemistry.* **293** (2), 251–257.
<https://doi.org/10.1006/abio.2001.5136>
46. Liu X.-Y., Nakamura C., Hasegawa M., Miyake J. 2003. Effect of lipid composition on phospholipase A2-catalyzed membrane leakage in immobilized liposomes: Sensitization for polychlorinated biphenyls detection with antibody affinity column tandem with fluorescent liposome column. *Electrophoresis.* **24** (18), 3165–3171.
<https://doi.org/10.1002/elps.200305530>
47. Liu X.-Y., Nakamura C., Nakamura N., Hirano T., Shinbo T., Miyake J. 2005. Detection of polychlorinated biphenyls using an antibody column in tandem with a fluorescent liposome column. *J. Chromatography A.* **1087** (1–2), 229–235.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.013>
48. Chen H., Lim S.K., Chen P., Huang J., Wang Y., Palaniappan A., Platt M., Leidberg B., Tok A. 2015. Reporter-encapsulated liposomes on graphene field effect transistors for signal enhanced detection of physiological enzymes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17** (5), 3451–3456.
<https://doi.org/10.1039/C4CP04644G>
49. Li J., Zhang Y., Ai J., Gao Q., Qi H., Zhang C., Cheng Z. 2016. Quantum dot cluster (QDC)-loaded phospholipid micelles as a FRET probe for phospholipase A2 detection. *RSC Advances.* **6** (19), 15895–15899.
<https://doi.org/10.1039/C5RA25292J>
50. Chen S.-H., Hsu Y.-P., Lu H.-Y., Ho J.A. 2014. Gold/Phospholipid nanoconstructs as label-free optical probes for evaluating phospholipase A2 activity. *Biosensors and Bioelectronics.* **52**, 202–208.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.08.017>
51. Guo C., Zhang Y., Li Y., Xu S., Wang L. 2019. 19 F MRI nanoprobe for the turn-on detection of phospholipase A2 with a low background. *Analyt. Chem.* **91** (13), 8147–8153.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00435>

Phospholipase A2. Methods for Monitoring Activity

A. S. Alekseeva¹ and I. A. Boldyrev^{1,*}

¹*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

**e-mail: ivan@lipids.ibch.ru*

Phospholipases A2 (PLA2) are hydrolytic proteins which cleave fatty acid in the second position (*sn*-2) of the phospholipid. An increased activity of PLA2 correlates with the course of many different inflammatory processes in the body. For the purpose of diagnosing and predicting pathological processes, systems for detecting PLA2 activity are being developed. A key component of all test systems is a substrate of lipid or non-lipid nature, the breakdown of which by the enzyme leads to the appearance of the analyzed signal. By themselves, lipids do not absorb light in the visible region and do not fluoresce. Therefore, to determine the activity of PLA2, substrates with different labels are developed. Test systems for determining the activity of PLA2 can be divided into three groups, depending on what stage of the enzyme action a signal is formed: 1) systems

based on the detection of hydrolysis products; 2) systems based on the cleavage of fluorescently labeled substrates; 3) systems based on the detection of membrane destruction. Each of these groups has its own requirements for the structure of the substrate. This review is focused on the structure of PLA2 substrates used in systems to determine enzyme activity; the proposed classification allows one to identify the strengths and weaknesses of existing detection systems and will be relevant when designing new test systems.

Keywords: phospholipase A2, enzyme activity, lipids, PLA2 substrates, fluorescent probes

УДК 577.352

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГРАНИЦ УПОРЯДОЧЕННЫХ ЛИПИДНЫХ ДОМЕНОВ И АМФИПАТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ РЕГУЛИРУЕТ ВЕРОЯТНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ ПОР В МЕМБРАНАХ

© 2020 г. К. В. Пинигин^а, М. В. Воловик^{а, б}, О. В. Батищев^а, С. А. Акимов^{а, *}

^аИнститут физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина, РАН, Москва, 119071 Россия

^бМосковский физико-технический институт (государственный университет),
Московская обл., Долгопрудный, 141700 Россия

*e-mail: akimov_sergey@mail.ru

Поступила в редакцию 02.04.2020 г.

После доработки 16.05.2020 г.

Принята к публикации 17.05.2020 г.

В состав биологических мембран входят различные липиды. Гетерогенный липидный состав может приводить к фазовому разделению с образованием упорядоченных липидных доменов, отличающихся по липидному составу от неупорядоченной части мембраны. Деформации мембраны, возникающие на границе доменов, могут влиять на латеральное распределение различных мембранных включений. В данной работе в рамках теории упругости липидных мембран рассмотрено влияние границ липидных доменов на латеральное распределение амфипатических пептидов, адсорбированных на мембране. Такие пептиды способны вызывать образование сквозных пор. Показано, что при увеличении поверхностной концентрации амфипатические пептиды сначала выстраиваются в линию вблизи границы домена параллельно ей и не способны индуцировать образование пор. Затем, когда вся граница домена оказывается занята, новые пептиды располагаются параллельно линии пептидов, которые уже находятся на границе, на расстоянии приблизительно 5 нм от границы. В такой конфигурации повышается вероятность образования сквозных пор в мембране. Кроме того, показано, что спонтанная кривизна монослоев упорядоченного домена и неупорядоченной мембраны определяет энергию встраивания пептидов в мембрану и их распределение между двумя фазами, но практически не влияет на их взаимодействие с границей упорядоченного домена.

Ключевые слова: липидная мембрана, упорядоченный домен, теория упругости, амфипатический пептид, порация

DOI: 10.31857/S0233475520050096

ВВЕДЕНИЕ

Живая клетка является открытой неравновесной системой. Для ее существования необходимо поддержание относительно постоянного внутреннего состава, отличного от состава окружающей клетку среды. Это достигается за счет отделения клеточных органелл от цитоплазмы и клетки в целом от окружающей среды мембранами, основу которых составляет липидный матрикс, тонкая бимолекулярная пленка, сформированная молекулами липидов. Вследствие амфифильной природы липидов, собранные из них мембраны обладают чрезвычайно низкой проницаемостью к различным веществам, что определяет основную — барьерную, функцию мембран в клетках [1]. В частности, в организмах млекопитающих мембраны позволяют клеткам поддерживать относительно постоянный внутренний ионный состав, значительно отличающийся от ионного со-

става внешней для клеток среды. В норме контролируемое прохождение заряженных молекул сквозь клеточные мембраны обеспечивается разнообразными ионными каналами. Резкое неконтролируемое повышение проницаемости мембран, как правило, приводит к гибели клеток. На повышении проницаемости мембран клеток патогенных микроорганизмов основано действие некоторых антибиотиков [2]. В частности, антимикробные амфипатические пептиды, такие как мелиттин и магаинин, связываются с бактериальными мембранами и формируют в них сквозные поры [3].

Антимикробные пептиды, формирующие в мембранах сквозные поры, как правило, являются амфипатическими, т.е. сочетают в своей структуре заряженные, полярные и гидрофобные аминокислоты. При взаимодействии с липидной мембраной такие пептиды частично встраиваются в липидный монослой таким образом, чтобы

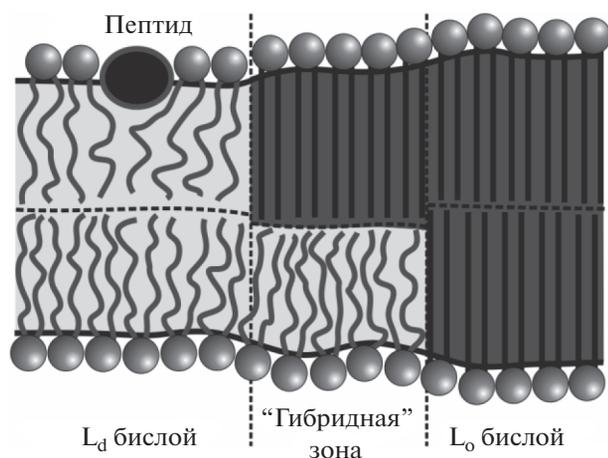


Рис. 1. Структура мембраны вблизи границы упорядоченного домена. Между жидко-упорядоченным L_O бислоем домена (справа) и жидко-неупорядоченным L_D бислоем остальной части мембраны (слева) находится «гибридная» зона, в которой один монослой — жидко-упорядоченный, а другой — жидко-неупорядоченный. L_O монослои показаны темно-серым цветом, L_D монослои — светло-серым цветом. Частично встроенный в монослой амфипатический пептид (показан черным эллипсом с серым контуром) вытесняет в стороны полярные головки липидов; гидрофобные цепи липидов заполняют объем под пептидом.

экспонировать в воду заряженные и полярные аминокислоты и скрыть от контакта с водой гидрофобные аминокислоты путем погружения их в мембрану [4–6]. Частичное встраивание пептидной α -спирали в липидный монослой неизбежно приводит к нарушению равновесной упаковки липидных молекул вблизи пептида, т.е. индуцирует упругие деформации мембраны, при которых липидные полярные головки вытесняются в стороны, а гидрофобные цепи липидов заполняют объем под частично встроенным пептидом (рис. 1). Это приводит к увеличению площади липидного монослоя, в который частично встроены амфипатические пептиды, а также к изменению его спонтанной кривизны: такой монослой стремится стать выпуклым, т.е. обладает положительной спонтанной кривизной [7, 8]. Такой же спонтанной кривизной обладают лизоформы липидов, которые, как известно, способствуют образованию пор в мембранах, поскольку при положительной спонтанной кривизне липидного монослоя значительно уменьшается линейное натяжение кромки поры [9–12]. При односторонней адсорбции амфипатических пептидов на замкнутые мембранные бислои, например, гигантских однослойных везикул (ГОВ), за счет встраивания пептидов увеличивается площадь поверхности наружного монослоя без изменения средней площади, приходящейся на одну липидную молекулу. Однако площади наружного и внутреннего монослоев ГОВ должны быть приблизительно равны друг

другу. Это означает, что при адсорбции амфипатических пептидов на наружный монослой ГОВ внутренний монослой будет растягиваться, т.е. в нем возникнет латеральное натяжение [13, 14]. Таким образом, амфипатические пептиды могут понижать энергетический барьер образования сквозной поры в мембране как путем уменьшения линейного натяжения кромки (за счет индуцируемой положительной спонтанной кривизны), так и путем увеличения латерального натяжения замкнутых липидных бислоев (за счет частичного встраивания лишь в один из монослоев мембраны).

Вызванные пептидами деформации мембраны могут распространяться на несколько нанометров [15–18]. Когда расстояние между пептидами достаточно велико, индуцируемые ими деформации независимы, и их энергия аддитивна. Однако при сближении пептидов вызываемые ими деформации начинают перекрываться, что приводит к эффективному латеральному взаимодействию. Ранее мы показали, что глобальный минимум энергии деформаций мембраны достигается, когда оси двух α -спиральных амфипатических пептидов ориентированы параллельно, а пептиды расположены друг напротив друга на расстоянии ~ 4.7 нм [18]. При этом в области мембраны между пептидами плотность упругой энергии оказывается достаточной, чтобы понизить энергетический барьер образования поры приблизительно в 2 раза [15]. Таким образом, мы предполагаем, что наиболее вероятно образование поры посередине между параллельными пептидами. Поскольку расстояние между пептидами составляет ~ 4.7 нм, то, по крайней мере, исходно образующаяся пора должна быть чисто липидной [15]. Вероятность образования поры по такому механизму должна сильно зависеть от поверхностной концентрации пептидов. Хотя формально пора может быть образована двумя пептидными молекулами, эти пептиды за счет диффузии должны оказаться в узком диапазоне расстояний друг от друга, и угол между их осями также должен попасть в относительно узкий интервал значений [15].

Плазматические мембраны клеток млекопитающих и бактерий различаются электрическим зарядом наружного монослоя: он приблизительно нулевой у клеток млекопитающих и отрицательный — у бактериальных. Поэтому большой положительный заряд антимикробных пептидов обеспечивает их преимущественное связывание с бактериальными мембранами [2]. У типичных антимикробных пептидов, магаинина и мелиттина, в нормальных условиях электрические заряды равны +3 и +5 [5, 19, 20] соответственно. Однако одни лишь электростатические взаимодействия оказываются неспособны обеспечить высокую избирательность связывания пептидов исключительно с бактериальными мембранами. Несмотря

на наличие заряда, амфипатические пептиды могут встраиваться и разрушать мембраны эукариотических клеток за счет гидрофобных взаимодействий. Поэтому большинство таких пептидов оказываются токсичными для человека, что значительно ограничивает возможности их применения в качестве антибиотиков.

В наружных монослоях плазматических мембран клеток млекопитающих содержится значительное количество насыщенных липидов с относительно высокой температурой фазового перехода жидкость–гель, в частности, дипальмитоилсфингомиелина [21, 22]. В модельных мембранах, сформированных из насыщенных липидов, ненасыщенных липидов (с относительно низкой температурой фазового перехода жидкость–гель, например, диолеилфосфатидилхолина [23]) и холестерина, взятых в соотношении близком к таковому в наружных монослоях плазматических мембран, при понижении температуры наблюдается макроскопическое фазовое разделение с образованием жидко-упорядоченной (L_o) и жидко-неупорядоченной (L_d) фаз. Домены L_o фазы практически всегда оказываются бислойнными, т.е. если в одном монослое имеется упорядоченный домен, то в противоположном монослое в том же месте также будет располагаться упорядоченный домен [24]. Предполагается, что сопряжение доменов в бислойные структуры обеспечивается нормальными тепловыми флуктуациями формы мембраны [25, 26]. Вследствие различной упорядоченности липидных гидрофобных цепей бислои L_o и L_d фазы имеют разную толщину [27, 28]. Если бы L_o и L_d участки мембраны были бы плоскими и однородными вплоть до межфазной границы, на границе возник бы скачок толщины бислоя, вдоль которого гидрофобная зона мембраны экспонировалась бы в воду. Линейное натяжение такой границы составляло бы по порядку величины 20–40 пН [29], что приблизительно на два порядка превосходит значения линейного натяжения, измеряемые в экспериментах (обычно ~ 1 пН) [24, 30]. Для уменьшения площади контакта полярной и гидрофобной сред мембраны вблизи границы должны деформироваться. Деформации требуют затрат энергии; однако, как следует из теоретических оценок, они энергетически значительно более выгодны по сравнению с экспонированием гидрофобной части мембраны в воду, поэтому за счет деформаций скачок толщины бислоя на границе L_o и L_d фаз закрывается полностью, т.е. поверхности монослоев на границе становятся непрерывными [29].

Деформации мембраны распространяются на несколько нанометров от вызывающих их объектов, в частности, границы упорядоченных доменов [17, 31, 32]. Если в мембране с сосуществующими L_o и L_d фазами имеется амфипатический α -спиральный пептид, частично встроенный в ли-

пидный монослой, то при сближении пептида и границы домена вызываемые ими деформации начинают перекрываться, приводя к их взаимодействию. Вдали от границы домена мембрана плоская, т.е. ее геометрическая кривизна равна нулю. Частично встроенный амфипатический пептид индуцирует положительную спонтанную кривизну, т.е. ему энергетически выгодно располагаться в локально выпуклых областях липидного монослоя. Такие области могут появляться только вблизи межфазной границы, где вследствие деформаций, направленных на сглаживание скачка толщины L_o и L_d бислоев, локальная геометрическая кривизна поверхности липидного монослоя может стать отличной от нуля. Ранее мы показали, что глобальный минимум энергии деформаций мембраны достигается, когда частично встроенный амфипатический α -спиральный пептид расположен в L_o фазе в непосредственной близости от межфазной границы [16]. Таким образом, амфипатические пептиды должны накапливаться на границе упорядоченных доменов.

В настоящей работе мы рассматриваем, каким образом упругие деформации опосредуют латеральное взаимодействие двух амфипатических пептидов при наличии в мембране границы L_o и L_d фаз. Деформации возникают вблизи обоих пептидов и межфазной границы. Из анализа полной упругой энергии, рассчитываемой в рамках теории упругости липидных мембран, следует, что пептидам энергетически выгодно занимать границу упорядоченного домена, выстраиваясь на ней в линию. В такой конфигурации образование пор пептидами невозможно, т.е. наличие границы L_o и L_d фаз препятствует порации мембран. Однако при полном заполнении межфазной границы пептидами, следующая пептидная молекула неизбежно столкнется с протяженной линией пептидов, стоящих на границе. В этом случае образование поры в мембране представляется значительно более вероятным, чем при случайном блуждании двух пептидных молекул по мембране большой площади, поскольку положение и ориентация одной из двух пептидных молекул, участвующих в формировании поры, оказываются фиксированными. Таким образом, наличие межфазной границы должно препятствовать образованию пор при низкой поверхностной концентрации пептидов и стимулировать порацию – при высокой.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Для расчета энергии деформаций воспользуемся теорией упругости жидких кристаллов, адаптированной к липидным мембранам, в рамках подхода Хамма–Козлова [33]. В этой теории средняя ориентация липидных молекул в моно-

слое характеризуется полем единичных векторов \mathbf{n} , называемых директорами. Директоры направлены от полярных головок липидов в сторону межмонослойной поверхности мембраны. Поле директоров считается заданным на некоторой поверхности, называемой разделяющей, проходящей внутри монослоя параллельно его внешней полярной поверхности. Форма разделяющей поверхности характеризуется векторным полем ее единичных нормалей \mathbf{N} , также направленных в сторону межмонослойной поверхности мембраны. В исходном недеформированном состоянии директоры и нормали параллельны друг другу. Мы рассматриваем следующие деформации: 1) поперечный изгиб, характеризующийся дивергенцией директора вдоль разделяющей поверхности, $\text{div}(\mathbf{n})$; 2) наклон, характеризующийся вектором наклона $\mathbf{t} = \mathbf{n}/(\mathbf{nN}) - \mathbf{N}$; 3) латеральное растяжение–сжатие, характеризующееся относительным изменением площади разделяющей поверхности, $\alpha = (a - a_0)/a_0$ (здесь a , a_0 – текущая и исходная площади разделяющей поверхности, приходящиеся на одну липидную молекулу); 4) латеральное натяжение мембраны, характеризующееся изменением полной площади разделяющей поверхности относительно плоского состояния вследствие деформации. В качестве базового состояния, от энергии которого отсчитывается энергия деформаций, выбран плоский липидный монослой. Деформации считаются малыми, и энергия вычисляется во втором порядке по ним. Для липидного монослоя упругая энергия может быть записана в следующем виде [16, 34]:

$$W = \int dS \left\{ \frac{B}{2} (\text{div}(\mathbf{n}) + J_0)^2 - \frac{B}{2} J_0^2 + \frac{K_t}{2} \mathbf{t}^2 + \frac{K_a}{2} (\alpha - \alpha_0)^2 + \sigma_0 \right\} - \sigma_0 A_0, \quad (1)$$

где B , K_t , K_a , σ_0 – модули поперечного изгиба, наклона, латерального растяжения–сжатия, а также латеральное натяжение, соответственно (в расчете на один липидный монослой); $\alpha_0 = \sigma_0/K_a$ – спонтанное латеральное растяжение монослоя из-за приложенного к нему латерального натяжения σ_0 ; J_0 – спонтанная кривизна монослоя (спонтанная кривизна лизоформ липидов считается положительной). Интегрирование ведется по разделяющей поверхности монослоя, и A_0 – исходная площадь разделяющей поверхности в базовом состоянии. Функционал упругой энергии (1) записан для специфической разделяющей поверхности, для которой модуль упругости, стоящий при слагаемом, перекрестном по деформациям поперечного изгиба и латерального растяжения–сжатия, оказывается равен нулю. Такая поверхность называется нейтральной. Экспериментально было показано, что нейтральная поверхность существует и проходит в области сочле-

нения полярных головок и гидрофобных цепей липидов, на глубине ~ 0.7 нм от внешней поверхности липидного монослоя [35]. Ниже будем относить все деформации, величины модулей упругости, спонтанную кривизну и спонтанное латеральное растяжение–сжатие к нейтральной поверхности.

Модуль объемного сжатия мембран очень велик и по порядку величины составляет $\sim 10^9 - 10^{10}$ Дж/м³ [36, 37]. Это позволяет считать гидрофобную часть липидного монослоя эффективно локально объемно несжимаемой. Условие объемной несжимаемости с требуемой точностью может быть записано в виде [16, 33, 34]:

$$h_c = h - \frac{h^2}{2} \text{div}(\mathbf{n}) - h\alpha, \quad (2)$$

где h_c – текущая локальная толщина гидрофобной зоны монослоя; h – толщина гидрофобной зоны монослоя в базовом состоянии. Ниже для простоты будем называть h_c и h просто толщиной монослоя.

Характерные длины изменения деформаций мембраны составляют несколько нанометров по порядку величины [18, 34]. Экспериментальные оценки радиусов доменов, зарегистрированных в клеточных мембранах, попадают в диапазон $\sim 25 - 100$ нм [38–41]. Минимальный размер доменов в модельных мембранах, определяемый методами атомной силовой микроскопии [27] и флуоресцентной микроскопии [42, 43], составляет несколько десятков нанометров. Таким образом, в практически важных случаях размеры упорядоченных доменов значительно превосходят характерные длины изменения деформаций мембраны. Это означает, что при расчетах можно пренебречь кривизной границы домена и считать границу прямой линией, вдоль которой система обладает трансляционной симметрией. Кроме того, ранее мы показали [16, 18], что при анализе взаимодействия двух пептидов или пептида с границей домена можно также пользоваться одномерным приближением, т.е. считать систему трансляционно симметричной вдоль некоторого направления, при условии корректного выбора эффективной длины пептида вдоль направления трансляционной симметрии. Для частично встроенных в мембрану амфипатических пептидов эффективная длина составляла приблизительно реальную длину пептидной α -спирали плюс 1–2 характерные длины затухания энергии деформаций, т.е. приблизительно плюс 2 нм [18].

Будем считать, что мембрана расположена горизонтально. Величины, относящиеся к верхнему монослою, будем обозначать индексом “ u ”, к нижнему монослою – индексом “ l ”. Будем также считать, что амфипатические пептиды встроены в верхний монослой. Введем декартову систему

координат $Oxuz$ таким образом, чтобы ось Oz была перпендикулярна плоской нейтральной поверхности монослоев в базовом состоянии; ось Oy была направлена вдоль границы упорядоченного домена, т.е. вдоль направления трансляционной симметрии; ось Ox была направлена перпендикулярно границе домена; плоскость Oyz содержала прямую линию границы упорядоченного домена нижнего монослоя. В такой системе координат все деформации зависят только от координаты x . Соответственно, все векторные величины можно заменить их проекциями на ось Ox : $\mathbf{n} \rightarrow n_x = n$, $\mathbf{N} \rightarrow N_x = N$, $\mathbf{t} \rightarrow t_x = t$; кроме того, с требуемой точностью $\text{div}(\mathbf{n}) \approx dn/dx$, $t \approx n - N$.

Форма мембраны характеризуется тремя функциями: 1) $H_u(x)$ – расстояние от плоскости Oxy до нейтральной поверхности верхнего монослоя; 2) $H_l(x)$ – расстояние от плоскости Oxy до нейтральной поверхности нижнего монослоя; 3) $M(x)$ – расстояние от плоскости Oxy до межмонослойной поверхности; все расстояния измеряются вдоль перпендикуляра к плоскости Oxy . В таких обозначениях условие локальной объемной несжимаемости, Ур. (2), для верхнего и нижнего монослоев, соответственно, может быть записано в виде [16, 18]:

$$\begin{aligned} H_u - M &= h_u - \frac{h_u^2}{2} n'_u - h_u \alpha_u, \\ M - H_l &= h_l - \frac{h_l^2}{2} n'_l - h_l \alpha_l, \end{aligned} \quad (3)$$

где штрих обозначает производную по координате x . Эти уравнения позволяют выразить относительное латеральное растяжение-сжатие, α , через функции $H(x)$, $M(x)$ и производную проекции дивектора, n' :

$$\begin{aligned} \alpha_u &= 1 - \frac{h_u}{2} n'_u + \frac{1}{h_u} M - \frac{1}{h_u} H_u, \\ \alpha_l &= 1 - \frac{h_l}{2} n'_l - \frac{1}{h_l} M + \frac{1}{h_l} H_l. \end{aligned} \quad (4)$$

Заметим, что с требуемой точностью $N_u = dH_u/dx$, $N_l = -dH_l(x)/dx$, $dS = L_y dx \sqrt{1 + (\text{grad}H)^2} \approx L_y dx \left(1 + \frac{1}{2}(H')^2\right)$, где L_y – длина рассматриваемого участка мембраны вдоль оси Oy , которую без ограничения общности можно положить равной единице. С учетом вышесказанного запишем в общем виде функционал упругой энергии липидного бислоя:

$$\begin{aligned} W &= \int dx \left\{ \frac{B_u}{2} (n'_u + J_u)^2 - \frac{B_u}{2} J_u^2 + \frac{K_t^u}{2} (n_u - H'_u)^2 + \right. \\ &+ \left. \frac{\sigma_0^u}{2} (H'_u)^2 + \frac{K_a^u}{2h_u^2} \left(h_u - \frac{h_u^2}{2} n'_u + M - H_u - h_u \alpha_u \right)^2 \right\} + \\ &+ \int dx \left\{ \frac{B_l}{2} (n'_l + J_l)^2 - \frac{B_l}{2} J_l^2 + \frac{K_t^l}{2} (n_l + H'_l)^2 + \right. \\ &+ \left. \frac{\sigma_0^l}{2} (H'_l)^2 + \frac{K_a^l}{2h_l^2} \left(h_l - \frac{h_l^2}{2} n'_l - M + H_l - h_l \alpha_l \right)^2 \right\}. \end{aligned} \quad (5)$$

В данном функционале учитывается, что бислоем может состоять как из двух одинаковых, так и из двух различных монослоев, а именно из L_o монослоя и L_d монослоя, имеющих различную толщину, модули упругости, спонтанную кривизну, латеральное натяжение. Хотя экспериментально наблюдаемая L_o фаза практически всегда бислойна, ранее мы теоретически показали, что бислойный L_o домен должен быть окружен полосой “гибридного” бислоя, в котором один монослой находится в L_o состоянии, в другой – в L_d [31, 44, 45] (рис. 1).

В ряде работ такие “гибридные” участки мембраны вблизи упорядоченных доменов наблюдались методами молекулярной динамики [46–48]. Характерная ширина “гибридной” полосы составляет всего 2–4 нм, и зарегистрировать ее напрямую в физическом эксперименте до сих пор не удавалось. Таким образом, мембрана вблизи границы домена может быть разделена на три зоны: 1) бислойная L_d мембрана, в которой оба монослоя находятся в жидко-неупорядоченном состоянии; 2) “гибридная” зона, в которой один монослой находится в L_d , а другой – в L_o состоянии; 3) бислойный L_o домен, в котором оба монослоя находятся в жидко-упорядоченном состоянии (рис. 1). При наличии в системе частично встроенного в мембрану амфипатического пептида необходимо отдельно рассматривать участок монослоя, напротив которого расположен пептид.

В работе [33] было показано, что модуль наклона приблизительно равен поверхностному натяжению границы вода-декан и, таким образом, практически не зависит от конкретной химической структуры и фазового состояния липида.

Поэтому ниже мы будем считать, что всегда $K_t^u = K_t^l = K_t = K_r$. Латеральное растяжение-сжатие является относительно жесткой деформационной модой, т.е. $K_a \gg K_r$, особенно в мембранах с высоким содержанием холестерина [33, 49]. Это означает, что энергия, запасаемая в данной деформационной моде, относительно мала; в ряде задач, не требующих высокой точности расчетов, эту деформацию вообще не рассматривают. Это позво-

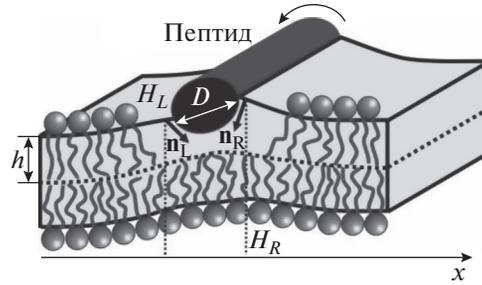


Рис. 2. На границе частично встроенного в липидный монослой амфипатического пептида накладываются граничные условия на скачок проекций директора справа (\mathbf{n}_R) и слева (\mathbf{n}_L) от пептида, а также на положения нейтральной поверхности верхнего монослоя справа (H_R) и слева (H_L) от пептида. D – диаметр α -спирали пептида; h – толщина гидрофобной части монослоя.

ляет, в частности, не учитывать возможное различие модулей латерального растяжения-сжатия L_o и L_d монослоев, т.е. считать, что $K_a^u = K_a^l = K_a$. Кроме того, будем считать, что к верхнему и нижнему монослоям приложено одно и то же латеральное натяжение, т.е. $\sigma_0^u = \sigma_0^l = \sigma_0$.

Функционал энергии (5) записывается для каждой зоны мембраны. Вариация функционала по функциям n_u, n_l, H_u, H_l, M приводит к линейным дифференциальным уравнениям Эйлера–Лагранжа. Решения, полученные для различных зон, сшиваются на их границах, исходя из непрерывности директора и нейтральной поверхности всюду, кроме области верхнего монослоя, занятой пептидом. Кроме того, считается, что мембрана остается невозмущенной вдали от пептидов и границы L_o домена. На левой и правой границах пептида ставятся специфические граничные условия на проекцию директора и положение нейтральной поверхности. Для примыкающих к пептиду верхних монослоев записываются граничные условия, отвечающие скачку проекций директора справа и слева от пептида, а также возможности вращения спирального пептида вокруг его продольной оси симметрии: $n_L - n_R = \Delta n$ и $H_R - H_L = (1/2)D(n_L + n_R)$, где n_L и n_R – проекции директора на ось Ox на левой и правой границах пептида соответственно, H_L и H_R – значения функции $H_u(x)$, характеризующей форму нейтральной поверхности верхнего монослоя, на левой и правой границах пептида соответственно, D – диаметр пептида, который полагается равным 1.3 нм, т.е. приблизительно равным диаметру α -спирали (рис. 2).

Значение скачка проекции директора Δn оценивается, исходя из геометрических соображений: полагается, что директора на левой и правой границах пептида направлены в центр масс участка монослоя, расположенного непосредственно под пептидом: $\Delta n = D/\sqrt{(h/2)^2 + (D/2)^2}$, где h – гидро-

фобная толщина монослоя, в котором находится пептид (рис. 2). В случае, когда пептид расположен на границе упорядоченного липидного домена и неупорядоченной мембраны, граничный скачок проекции директора полагается равным линейной комбинации $\Delta n = \delta D/\sqrt{(h_d/2)^2 + (D/2)^2} + (1 - \delta) D/\sqrt{(h_s/2)^2 + (D/2)^2}$, где h_s и h_d – гидрофобные толщины монослоев неупорядоченной мембраны и упорядоченного домена соответственно, а δ и $(1 - \delta)$ – доли диаметра пептида, находящиеся в упорядоченном домене и неупорядоченной мембране соответственно.

РЕШЕНИЕ ЗАДАЧИ

Уравнения Эйлера–Лагранжа для бислоя. Вариация функционала упругой энергии (5) по функциям $n_u(x), n_l(x), H_u(x), H_l(x), M(x)$ приводит к пяти линейным дифференциальным уравнениям Эйлера–Лагранжа, имеющим следующий вид:

$$\left\{ \begin{array}{l} \left(I_u^2 + \frac{h_u^2 A}{4} \right) n_u'' - n_u - \frac{A}{2} M' + \left(1 + \frac{A}{2} \right) H_u' = 0, \\ \left(I_l^2 + \frac{h_l^2 A}{4} \right) n_l'' - n_l + \frac{A}{2} M' - \left(1 + \frac{A}{2} \right) H_l' = 0, \\ \left(1 + \frac{A}{2} \right) n_u' - (1 + \sigma) H_u'' + \\ + \frac{A}{h_u^2} (H_u - M - h_u (1 - \alpha_0)) = 0, \\ \left(1 + \frac{A}{2} \right) n_l' + (1 + \sigma) H_l'' - \\ - \frac{A}{h_l^2} (H_l - M + h_l (1 - \alpha_0)) = 0, \\ n_u' - n_l' + \frac{2}{h_u^2} (H_u - M - h_u (1 - \alpha_0)) + \\ + \frac{2}{h_l^2} (H_l - M + h_l (1 - \alpha_0)) = 0, \end{array} \right. \quad (6)$$

где $l_u = (B_u/K_t)^{1/2}$, $l_l = (B_l/K_t)^{1/2}$, $A = K_a/K_t$, $\sigma = \sigma_0/K_t$.
Путем линейных преобразований из данной си-

стемы возможно получить изолированное уравнение для H_u :

$$\begin{aligned} & (4l_u^2 l_l^2 (h_u^2 + h_l^2) + A(h_u^4 l_l^2 + h_l^4 l_u^2)) H_u^{(8)} + \frac{4A(l_u^2 h_l^2 + l_l^2 h_u^2 - 2l_u^2 l_l^2) - A\sigma(l_u^2 + l_l^2)(h_u^2 + h_l^2) - 4\sigma(l_u^2 + l_l^2)(h_u^2 + h_l^2)}{1 + \sigma} H_u^{(6)} + \\ & + \frac{4\sigma^2(h_u^2 + h_l^2) + 4A(l_u^2 + l_l^2) + 4A\sigma(2l_u^2 + 2l_l^2 - h_u^2 - h_l^2)}{(1 + \sigma)^2} H_u^{(4)} - \frac{8A\sigma}{(1 + \sigma)^2} H_u'' = 0. \end{aligned} \quad (7)$$

Общее решение данного уравнения имеет вид:

$$H_u(x) = c_1 e^{-q_1 x} + c_2 e^{q_1 x} + c_3 e^{-q_2 x} + c_4 e^{q_2 x} + c_5 e^{-q_3 x} + c_6 e^{q_3 x} + c_7 x + c_8, \quad (8)$$

где c_1, c_2, \dots, c_6 — комплексные, а c_7, c_8 — действительные постоянные коэффициенты, которые следует определить из граничных условий; q_1, q_2, q_3 — обратные характерные длины деформаций, которые известным образом зависят от упругих параметров мембраны, однако соответствующие выражения слишком громоздки и поэтому здесь не приводятся. После подстановки уравнения (8) в систему (6) находятся остальные функции ($n_u(x), n_l(x), H_l(x), M(x)$); система уравнений (6) решается аналитически, но получающиеся выражения очень громоздки.

Уравнения Эйлера–Лагранжа для участка монослоя, расположенного напротив пептида. Выражение для энергии участка монослоя, расположенного напротив пептида, может быть записано в виде:

$$W = \int dx \left\{ \frac{B_l}{2} (n_l' + J_l)^2 - \frac{B_l}{2} J_l^2 + \frac{K_t}{2} (n_l + H_l)^2 + \frac{\sigma_0}{2} (H_l')^2 + \frac{K_a}{2h_l^2} \left(h_l - \frac{h_d^2}{2} n_l' - M + H_l - h_l \alpha_0 \right)^2 \right\}. \quad (9)$$

Вариация этого функционала по $n_l(x), H_l(x), M(x)$ приводит к трем уравнениям Эйлера–Лагранжа:

$$\begin{cases} \left(l_l^2 + \frac{h_l^2 A}{4} \right) n_l'' - n_l + \frac{A}{2} M' - \left(1 + \frac{A}{2} \right) H_l' = 0, \\ \left(1 + \frac{A}{2} \right) n_l' + (1 + \sigma) H_l'' - \\ - \frac{A}{h_l^2} (H_l - M + h_l (1 - \alpha_0)) = 0, \\ -n_l' + \frac{2}{h_l^2} (H_l - M + h_l (1 - \alpha_0)) = 0. \end{cases} \quad (10)$$

Линейные преобразования позволяют получить изолированное уравнение для H_l :

$$H_l^{(4)} + \frac{\sigma}{(\sigma + 1) l_l^2} H_l'' = 0, \quad (11)$$

общее решение которого имеет вид:

$$H_l(x) = d_1 e^{-p_1 x} + d_2 e^{p_1 x} + d_3 x + d_4, \quad (12)$$

где d_1, d_2, d_3, d_4 — действительные постоянные коэффициенты, которые следует определить из граничных условий; $p_1 = \frac{1}{l} \sqrt{\frac{\sigma}{1 + \sigma}}$. После подстановки выражения (12) для $H_l(x)$ в систему уравнений Эйлера–Лагранжа (10) аналитически находятся функции $n_l(x)$ и $M(x)$.

Спонтанная кривизна монослоев. Спонтанная кривизна монослоев не входит в уравнения Эйлера–Лагранжа (6), (10), и, таким образом, характерные длины деформаций и функциональный вид их пространственного распределения от спонтанной кривизны не зависят. Однако спонтанная кривизна влияет на латеральное распределение деформаций через величины постоянных коэффициентов c_1, c_2, \dots, c_8 и d_1, d_2, d_3, d_4 , (см. уравнения (8) и (12)). Часть этих коэффициентов определяется граничными условиями, описанными выше в разделе “Постановка задачи”. Однако количество граничных условий меньше, чем число коэффициентов. Коэффициенты, оставшиеся неопределенными после подстановки граничных условий, находятся путем минимизации по ним полной энергии системы. Из выражений (5), (9) видно, что при встраивании пептида в мембрану энергетический вклад, связанный со спонтанной кривизной, составляет $W_p = B J_0 \Delta n$.

Параметры, относящиеся к L_0 монослою, будем обозначать индексом “ d ”, к L_d монослою — индексом “ s ”. Плоский монослой с ненулевой спонтанной кривизной испытывает изгибный стресс, плотность энергии которого определяется величиной $w_s = (B/2) J_0^2$ (см. выражение (1)). Частичная релаксация изгибного стресса возможна за счет изменения ориентации директора на межфазной границе. При этом со стороны L_0 монослоя на граничный директор действует вращающий момент, равный $B_s J_s$, а со стороны L_d монослоя — $B_d J_d$. Итоговая ориентация директора на границе монослоев L_0 и L_d фаз определяется конкуренцией этих моментов. При спонтанных кривизнах монослоев, удовлетворяющих соотноше-

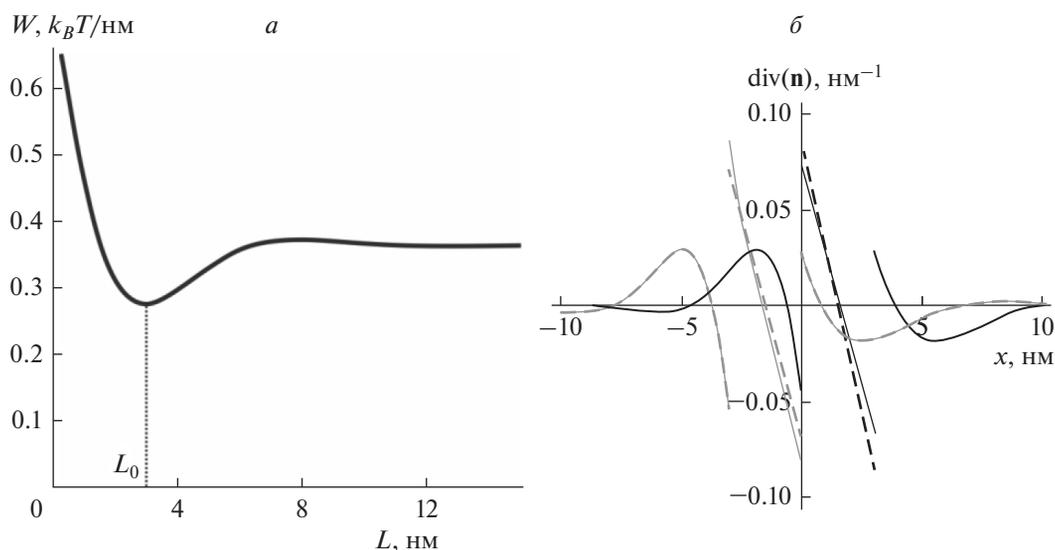


Рис. 3. Структура деформаций вблизи границы упорядоченного домена. *а* – Зависимость упругой энергии мембраны от относительного сдвига границ L монослойных упорядоченных доменов, расположенных в противоположных монослоях. При сдвиге $L_0 = \pm 3$ нм упругая энергия минимальна. *б* – Распределение дивергенции директора, $\text{div}(\mathbf{n})$, вблизи границы упорядоченного домена в верхнем монослое (сплошные кривые) и нижнем монослое (штриховые кривые). Черные кривые – $L_0 = 3$ нм; толстые серые кривые – $L_0 = -3$ нм.

нию $J_d = (B_s/B_d)J_s$, переориентации граничного директора не происходит [29]. Чтобы разделить эффекты релаксации упругих стрессов на межфазной границе и взаимодействия с границей встроенных пептидов, без ограничения общности всюду ниже будем считать, что спонтанные кривизны L_o и L_d монослоев удовлетворяют соотношению $J_d = (B_s/B_d)J_s$.

Упругие параметры мембраны. Для иллюстрации результатов расчетов использовались следующие значения упругих параметров мембраны. Модуль изгиба монослоя B полагался равным $20 k_B T$ и $10 k_B T$ ($T = 300$ К) для упорядоченного домена и неупорядоченной мембраны соответственно [49–52]; модуль наклона K_t полагался равным 40 мН/м $\approx 10 k_B T/\text{нм}^2$, исходя из оценки, приведенной в работе [33], и одинаковым для монослоев обеих фаз ($K_t^u = K_t^l = K_t$); модуль латерального растяжения-сжатия K_a полагался одинаковым для обеих фаз ($K_a^u = K_a^l = K_a$) и равным $K_a = 120$ мН/м $= 30 k_B T/\text{нм}^2$ [49, 52]; латеральное натяжение полагалось одинаковым в обоих монослоях в обеих фазах ($\sigma_0^u = \sigma_0^l = \sigma_0$) и равным $\sigma_0 = 0.01$ мН/м $= 0.0025 k_B T/\text{нм}^2$ [53]; спонтанное латеральное растяжение-сжатие $\alpha_0 = \sigma_0/K_a \approx 0.8 \times 10^{-4}$; гидрофобная толщина полагалась $h_d = 1.8$ нм и $h_s = 1.3$ нм для монослоев упорядоченного домена и неупорядоченной мембраны соответственно [28, 46, 47].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Структура границы L_o домена. Ранее было показано, что в равновесной конфигурации границы монослойных упорядоченных доменов, расположенных в противоположных монослоях мембраны, сдвинуты друг относительно друга на небольшое расстояние [16, 31, 44]. Для указанных выше упругих параметров мембраны величина сдвига составляет $L_0 = 3$ нм (рис. 3а). При таком сдвиге энергия деформаций мембраны, возникающих на границе доменов при компенсации разности толщин L_o и L_d монослоев, оказывается минимальной. В силу симметрии системы эта энергия оказывается минимальной также при относительном сдвиге границ монослойных доменов $L_0 = -3$ нм. На рис. 3б показано распределение вблизи границы упорядоченного домена величины $\text{div}(\mathbf{n})$, которая определяет эффективную локальную кривизну липидного монослоя (с точностью до знака). Вдали от границы $\text{div}(\mathbf{n}) \rightarrow 0$, а в переходной зоне $\text{div}(\mathbf{n}) \neq 0$, причем имеются участки, где $\text{div}(\mathbf{n}) > 0$ (локальная кривизна отрицательна) и $\text{div}(\mathbf{n}) < 0$ (локальная кривизна положительна).

Взаимодействие пептида с границей L_o домена. Частично встроенный в мембрану амфипатический пептид индуцирует положительную кривизну, или, что эквивалентно, обладает положительной спонтанной кривизной. Таким мембранным компонентам энергетически выгодно располагаться в областях липидного монослоя, в которых локальная кривизна положительна, т.е. $\text{div}(\mathbf{n}) < 0$. В мембране с сосуществующими L_o и L_d фазами такие области могут быть только вблизи межфаз-

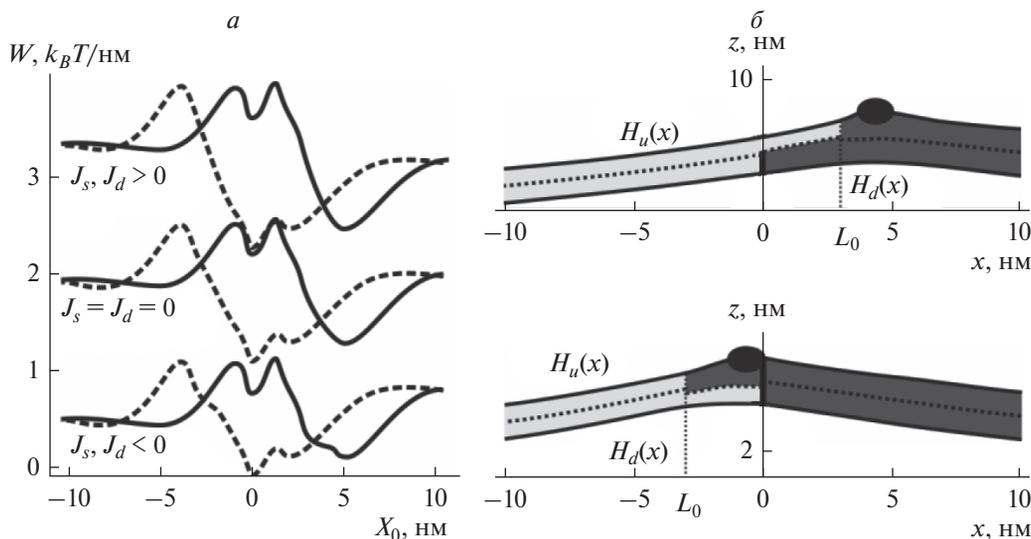


Рис. 4. Взаимодействие амфипатического пептида с границей упорядоченного домена. *a* – Зависимость линейного натяжения границы упорядоченного липидного домена от положения амфипатического пептида, встроенного в верхний монослой, при различных спонтанных кривизнах монослоев неупорядоченной мембраны J_s и домена J_d . По оси абсцисс отложена координата правой границы пептида X_0 , упорядоченный домен расположен в положительном направлении оси абсцисс, координата 0 соответствует положению границы упорядоченного домена в нижнем монослое. Сплошные линии соответствуют относительному сдвигу липидных монослойных доменов $L_0 = 3$ нм, штриховые – $L_0 = -3$ нм. Нижняя пара кривых – $J_s = -0.1$ нм⁻¹, $J_d = (B_s/B_d)J_s = -0.05$ нм⁻¹; средняя пара кривых – $J_s = J_d = 0$; верхняя пара кривых – $J_s = 0.1$ нм⁻¹, $J_d = (B_s/B_d)J_s = 0.05$ нм⁻¹. *б* – Форма мембраны с сосуществующими L_0 и L_d фазами (показаны темно-серым и светло-серым цветом соответственно) и частично встроенным амфипатическим пептидом (показан черным эллипсом) при оптимальном расположении пептида, при котором линейное натяжение границы имеет глобальный минимум (см. панель *a*). Верхний график – $L_0 = 3$ нм; нижний график – $L_0 = -3$ нм.

ной границы. На рис. 4*a* показана зависимость упругой энергии мембраны (отнесенной к единице длины вдоль границы домена) от положения пептида. В отсутствие пептида граница L_0 и L_d фаз симметрична относительно знака сдвига границ монослойных доменов L_0 : энергия границы одинакова при $L_0 = 3$ нм и $L_0 = -3$ нм. Однако при встраивании пептида в верхний монослой симметрия нарушается, и зависимость энергии от положения пептида оказывается различной в случаях $L_0 = 3$ нм и $L_0 = -3$ нм (рис. 4*a*).

Из расчетов следует, что минимуму энергии системы соответствует положение пептида вблизи границы упорядоченного домена (рис. 4*б*). При положительной спонтанной кривизне монослоев домена и неупорядоченной части мембраны упругая энергия системы увеличивается. При отрицательной спонтанной кривизне монослоев частично компенсируется положительная спонтанная кривизна, индуцируемая встроенным пептидом, и упругая энергия уменьшается. В целом, зависимость упругой энергии от положения пептида, соответствующие случаям с ненулевыми спонтанными кривизнами, сдвигаются вверх или вниз относительно зависимости для случая нулевых спонтанных кривизн; при этом форма зави-

симостей изменяется слабо, а глубина энергетической ямы в глобальном минимуме энергии не изменяется: $0.90 k_B T/\text{нм}$ при $L_0 = 3$ нм и $0.72 k_B T/\text{нм}$ при $L_0 = -3$ нм. После умножения на эффективную длину пептида можно получить абсолютное значение глубины минимума [18]. Так, для α -спирального пептида магаинина, состоящего из 23 аминокислот и, соответственно, имеющего длину $\sim 0.15 \text{ нм} \times 23 = 3.45$ нм, получаем: $0.90 k_B T/\text{нм} \times (3.45 + 2) \text{ нм} \approx 4.9 k_B T$ и $0.72 k_B T/\text{нм} \times (3.45 + 2) \text{ нм} \approx 3.9 k_B T$ для $L_0 = 3$ нм и $L_0 = -3$ нм соответственно. Эти значения глубины минимумов значительно превышают среднюю энергию теплового движения пептида ($\sim 1 k_B T$). Таким образом, пептид, оказываясь в положении, соответствующем глобальному минимуму упругой энергии, должен задерживаться в нем на продолжительное время.

При положительной спонтанной кривизне относительно понижается энергия при расположении пептида в упорядоченном домене вдали от границы; при отрицательной – напротив, при расположении в неупорядоченной мембране (рис. 4*a*). Предпочтительное расположение пептида в той или иной фазе связано с тем, что добавка к упругой энергии при ненулевой спонтанной

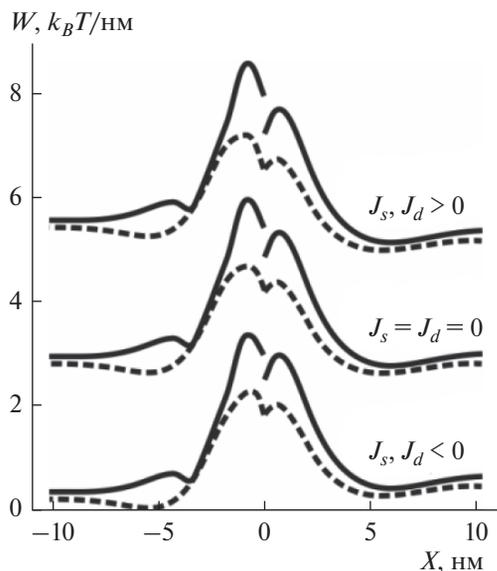


Рис. 5. Зависимость упругой энергии мембраны с сосуществующими L_0 и L_d фазами и двумя встроенными амфипатическими пептидами от расстояния между пептидами X при фиксированном оптимальном положении одного из пептидов вблизи границы упорядоченного домена (см. рис. 4). Пептиды встроены в верхний монослой мембраны. Зависимости рассчитаны для различных относительных сдвигов границ монослойных упорядоченных доменов: $L_0 = 3$ нм (сплошные линии) и $L_0 = -3$ нм (штриховые линии), а также для различных спонтанных кривизн монослоев неупорядоченной мембраны J_s и упорядоченного домена J_d : нижняя пара кривых $-J_s = -0.1$ нм $^{-1}$, $J_d = (B_s/B_d)J_s = -0.05$ нм $^{-1}$; средняя пара кривых $-J_s = J_d = 0$; верхняя пара кривых $-J_s = 0.1$ нм $^{-1}$, $J_d = (B_s/B_d)J_s = 0.05$ нм $^{-1}$. Отрицательное расстояние соответствует положению нефиксированного пептида слева от фиксированного.

кривизне составляет $W_p = BJ_0 \Delta n$; при этом мы выбирали величины спонтанных кривизн монослоев L_0 и L_d фаз так, чтобы $B_s J_s = B_d J_d$. Таким образом, энергия в фазах различается только за счет различной величины скачка проекции директора на границах пептида, Δn . Скачок директора $\Delta n_{s,d} = D/\sqrt{(h_{s,d}/2)^2 + (D/2)^2}$ оказывается большим в неупорядоченной мембране, чем в упорядоченном домене, поскольку $h_s < h_d$; соответственно, абсолютная величина энергетического сдвига $|W_p| = |BJ_0 \Delta n|$ при ненулевой спонтанной кривизне оказывается больше в неупорядоченной мембране, чем в домене, а знак сдвига совпадает со знаком спонтанной кривизны. Таким образом, при положительной спонтанной кривизне энергия при расположении пептида в неупорядоченной мембране относительно возрастает, а при отрицательной — относительно понижается (рис. 4а).

Мембрана с двумя встроенными пептидами. Зафиксируем один пептид в оптимальном положении вблизи границы упорядоченного домена, в соответствии с глобальным минимумом зависимости упругой энергии, изображенной на рис. 4а. Рассмотрим зависимость упругой энергии мембраны от положения второго пептида, который считается ориентированным параллельно границе домена и первому пептиду (рис. 5). На малом расстоянии пептиды отталкиваются (рис. 5).

Однако при расстоянии между пептидами приблизительно 5 нм упругая энергия мембраны имеет глобальный минимум глубины 0.16–0.23 $k_B T/\text{нм}$. Схожая зависимость энергии от расстояния между пептидами была получена для случая латерально однородной мембраны без сосуществующих L_0 и L_d фаз [15, 18]. Глубина минимума зависит от величины спонтанной кривизны монослоев мембраны и относительного сдвига границ монослойных упорядоченных доменов L_0 . Исключение составляет только случай $J_s = -0.1$ нм $^{-1}$, $L_0 = 3$ нм, при котором глубина глобального минимума составляет всего 0.02 $k_B T/\text{нм}$. При расчете зависимостей, показанных на рис. 5, положение одного из пептидов фиксировалось. Однако при малой вариации положения фиксированного пептида абсолютное значение энергии в глобальном минимуме возрастает (данные не показаны), и, таким образом, рассчитанные глобальные минимумы упругой энергии (рис. 5) являются глобальными минимумами упругой энергии системы при произвольном положении двух пептидов и фиксированном относительном сдвиге границ монослойных доменов. Аналогично рис. 4а, упругая энергия мембраны с двумя встроенными пептидами возрастает или уменьшается в зависимости от знака спонтанной кривизны липидных монослоев; форма графиков при этом изменяется незначительно.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе был проведен анализ влияния упругих деформаций липидного бислоя, возникающих на границе между жидко-упорядоченным липидным доменом и жидко-неупорядоченной мембраной, на взаимодействие амфипатических пептидов, частично встроенных в один из липидных монослоев. Расчеты показывают, что пептидам энергетически выгодно располагаться вблизи границы упорядоченного домена (рис. 4). При увеличении поверхностной концентрации пептидов им сначала энергетически выгодно заполнять свободные места вдоль границы упорядоченного липидного домена, располагаясь параллельно этой границе. Затем, при дальнейшем росте концентрации, когда вся граница домена заполняется полосой пептидов, очередным молекулам пеп-

тидов энергетически выгодно располагаться параллельно полосе, находящейся на границе домена, на расстоянии около 5 нм от нее (рис. 5).

Ранее было показано [18], что в латерально однородной мембране (без липидных доменов) двум пептидам энергетически выгодно располагаться параллельно друг другу на расстоянии ~4.7 нм друг от друга. В такой конфигурации может повышаться вероятность образования сквозной поры в мембране [15]. В области мембраны между параллельными пептидами плотность упругой энергии максимальна, и, согласно оценкам работы [15], эта упругая энергия достаточна для того, чтобы покрыть приблизительно половину энергетических затрат, необходимых для образования сквозной поры. Как показано в настоящей работе, наличие границы упорядоченного липидного домена может препятствовать образованию пор при малых концентрациях пептидов: в этих условиях пептидам энергетически выгодно выстраиваться в линию, заполняя свободные места на границе домена. Однако при высокой поверхностной концентрации пептидов, когда все вакантные места на границе домена уже заполнены, вероятность образования пор должна резко увеличиваться. Поскольку пептиды на границе доменов находятся в глубокой энергетической яме, количество их степеней свободы ограничено. При этом остальные пептидные молекулы, диффундируя по мембране, с высокой вероятностью столкнутся с протяженной линией пептидов, выстроенных вдоль границы, и расположатся параллельно этой линии из-за наличия энергетической ямы упругой энергии при расстоянии ~5 нм между пептидами (рис. 5). За счет этого должна повышаться вероятность образования сквозных пор. Таким образом, из результатов расчетов настоящей работы следует, что при низкой концентрации амфипатических пептидов упорядоченные домены должны оказывать протекторное действие, а при высокой — напротив, способствовать порации мембраны. Это позволяет объяснить противоречия в имеющихся экспериментальных данных по эффективности формирования пор амфипатическими пептидами в мембранах с сосуществующими L_0 и L_d фазами.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, а также Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-54-74001).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. 2017. *Molecular biology of the cell* (6th ed.). N.Y.: Garland Science.
2. Panteleev P.V., Bolosov I.A., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. 2015. Structure and biological functions of β -hairpin antimicrobial peptides. *Acta Naturae*. 7 (1), 37–47.
3. Fuertes G., Giménez D., Esteban-Martín S., Sánchez-Munoz O.L., Salgado J. 2011. A lipocentric view of peptide-induced pores. *Eur. Biophys. J.* 40, 399–415.
4. Pan J., Tieleman D.P., Nagle J.F., Kučerka N., Tristram-Nagle S. 2009. Alamethicin in lipid bilayers: Combined use of X-ray scattering and MD simulations. *Biochim. Biophys. Acta*. 1788, 1387–1397.
5. Chen C.H., Wiedman G., Khan A., Ulmschneider M.B. 2014. Absorption and folding of melittin onto lipid bilayer membranes via unbiased atomic detail microsecond molecular dynamics simulation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1838, 2243–2249.
6. Vácha R., Frenkel D. 2014. Simulations suggest possible novel membrane pore structure. *Langmuir*. 30, 1304–1310.
7. Fuller N., Rand R.P. 2001. The influence of lysolipids on the spontaneous curvature and bending elasticity of phospholipid membranes. *Biophys. J.* 81, 243–254.
8. Kollmitzer B., Heftberger P., Rappolt M., Pabst G. 2013. Monolayer spontaneous curvature of raft-forming membrane lipids. *Soft Matter*. 9, 10877–10884.
9. Akimov S.A., Volynsky P.E., Galimzyanov T.R., Kuzmin P.I., Pavlov K.V., Batishchev O.V. 2017. Pore formation in lipid membrane I: Continuous reversible trajectory from intact bilayer through hydrophobic defect to transversal pore. *Sci. Rep.* 7, 12152.
10. Akimov S.A., Volynsky P.E., Galimzyanov T.R., Kuzmin P.I., Pavlov K.V., Batishchev O.V. 2017. Pore formation in lipid membrane II: Energy landscape under external stress. *Sci. Rep.* 7, 12509.
11. Карпунин Д.В., Акимов С.А., Фролов В.А. 2005. Формирование пор в плоских липидных мембранах, содержащих лизолипиды и холестерин. *Биол. мембраны*. 22, 429–432.
12. Молотковский Р.Ю., Акимов С.А. 2009. Расчет линейного натяжения в различных моделях кромки поры в липидном бислое. *Биол. мембраны*. 26, 149–158.
13. Chen F.Y., Lee M.T., Huang H.W. 2003. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophys. J.* 84, 3751–3758.
14. Jackman J.A., Zan G.H., Zhdanov V.P., Cho N.J. 2013. Rupture of lipid vesicles by a broad-spectrum antiviral peptide: influence of vesicle size. *J. Phys. Chem. B*. 117, 16117–16128.
15. Акимов С.А., Александрова В.В., Галимзянов Т.Р., Батищев О.В. 2017. Взаимодействие амфипатических пептидов, опосредованное упругими деформациями мембраны. *Биол. мембраны*. 34, 162–173.
16. Pinigin K.V., Kondrashov O.V., Jiménez-Munigua I., Alexandrova V.V., Batishchev O.V., Galimzyanov T.R., Akimov S.A. 2020. Elastic deformations mediate interaction of the raft boundary with membrane inclusions leading to their effective lateral sorting. *Sci. Rep.* 10, 4087.
17. Akimov S.A., Frolov V.A., Kuzmin P.I., Zimmerberg J., Chizmadzhev Y.A., Cohen F.S. 2008. Domain forma-

- tion in membranes caused by lipid wetting of protein. *Phys. Rev. E* **77**, 051901.
18. Kondrashov O.V., Galimzyanov T.R., Jiménez-Mun-
guía I., Batishchev O.V., Akimov S.A. 2019. Mem-
brane-mediated interaction of amphipathic peptides
can be described by a one-dimensional approach. *Phys.
Rev. E* **99**, 022401.
 19. Matsuzaki K., Nakamura A., Murase O., Sugishita K.I.,
Fujii N., Miyajima K. 1997. Modulation of magainin
2– lipid bilayer interactions by peptide charge. *Bio-
chemistry* **36**, 2104–2111.
 20. Santo K.P., Berkowitz M.L. 2012. Difference between
magainin-2 and melittin assemblies in phosphatidyl-
choline bilayers: results from coarse-grained simula-
tions. *J. Phys. Chem. B* **116**, 3021–3030.
 21. Arsov Z., González-Ramírez E.J., Goñi F.M., Tris-
tram-Nagle S., Nagle J.F. 2018. Phase behavior of pal-
mitoyl and egg sphingomyelin. *Chem. Phys. Lipids* **213**,
102–110.
 22. Ingólfsson H.I., Melo M.N., Van Eerden F.J., Arnarez C.,
Lopez C.A., Wassenaar T.A., Periole X., de Vries A.H.,
Tieleman D.P., Marrink S.J. 2014. Lipid organization
of the plasma membrane. *J. Am. Chem. Soc.* **136**,
14554–14559.
 23. Jaschonek S., Cascella M., Gauss J., Diezemann G.,
Milano G. 2018. Intramolecular structural parameters
are key modulators of the gel-liquid transition in coarse
grained simulations of DPPC and DOPC lipid bilayers.
Biochem. Biophys. Res. Comm. **498**, 327–333.
 24. Baumgart T., Hess S.T., Webb W.W. 2003. Imaging co-
existing fluid domains in biomembrane models cou-
pling curvature and line tension. *Nature*. **425**, 821–824.
 25. Галимзянов Т.Р., Калуцкий М.А., Кондрашов О.В.,
Пинигин К.В., Молотковский Р.Ю., Кузьмин П.И.,
Батищев О.В., Акимов С.А. 2019. Нормальные
флуктуации формы биологических мембран как
фактор сопряжения упорядоченных монослойных
доменов. *Биол. мембраны*. **36**, 184–191.
 26. Galimzyanov T.R., Kuzmin P.I., Pohl P., Akimov S.A.
2017. Undulations drive domain registration from the
two membrane leaflets. *Biophys. J.* **112**, 339–345.
 27. Galimzyanov T.R., Lyushnyak A.S., Aleksandrova V.V.,
Shilova L.A., Mikhalyov I.I., Molotkovskaya I.M.,
Akimov S.A., Batishchev O.V. 2017. Line activity of gan-
glioside GM1 regulates raft size distribution in a cholester-
ol-dependent manner. *Langmuir*. **33**, 3517–3524.
 28. Rinia H.A., Snel M.M., van der Eerden J.P., de Kruijff B.
2001. Visualizing detergent resistant domains in model
membranes with atomic force microscopy. *FEBS Lett.*
501, 92–96.
 29. Kuzmin P.I., Akimov S.A., Chizmadzhev Yu.A., Zim-
merberg J., Cohen F.S. 2005. Line tension and interac-
tion energies of membrane rafts calculated from lipid
splay and tilt. *Biophys. J.* **88**, 1120–1133.
 30. Esposito C., Tian A., Melamed S., Johnson C., Tee S.Y.,
Baumgart T. 2007. Flicker spectroscopy of thermal lip-
id bilayer domain boundary fluctuations. *Biophys. J.*
93, 3169–3181.
 31. Галимзянов Т.Р., Молотковский Р.Ю., Кузь-
мин П.И., Акимов С.А. 2011. Стабилизация бис-
лойной структуры рафтов за счет упругих дефор-
маций мембраны. *Биол. мембраны*. **28**, 307–314.
 32. Галимзянов Т.Р., Молотковский Р.Ю., Калуц-
кий М.А., Пинигин К.В., Кузьмин П.И., Бати-
щев О.В., Акимов С.А. 2020. Латеральное взаимо-
действие влияет на кинетику метастабильных
сквозных пор в липидных мембранах. *Биол. мем-
браны*. **37**, 83–93.
 33. Hamm M., Kozlov M.M. 2000. Elastic energy of tilt
and bending of fluid membranes. *Eur. Phys. J. E* **3**,
323–335.
 34. Kondrashov O.V., Galimzyanov T.R., Pavlov K.V., Ко-
това Е.А., Antonenko Y.N., Akimov S.A. 2018. Mem-
brane elastic deformations modulate gramicidin A
transbilayer dimerization and lateral clustering. *Bio-
phys. J.* **115**, 478–493.
 35. Leikin S., Kozlov M.M., Fuller N.L., Rand R.P. 1996.
Measured effects of diacylglycerol on structural and elastic
properties of phospholipid membranes. *Biophys. J.* **71**,
2623–2632.
 36. Nagle J.F., Wilkinson D.A. 1978. Lecithin bilayers.
Density measurement and molecular interactions. *Bio-
phys. J.* **23**, 159–175.
 37. Terzi M.M., Deserno M., Nagle J.F. 2019. Mechanical
properties of lipid bilayers: a note on the Poisson ratio.
Soft Matter. **15**, 9085–9092.
 38. Frisz J.F., Lou K., Klitzing H.A., Hanafin W.P., Lizu-
nov V., Wilson R.L., Carpenter K.J., Kim R., Hutch-
eon I.D., Zimmerberg J., Weber P.K., Kraft M.L. 2013.
Direct chemical evidence for sphingolipid domains in
the plasma membranes of fibroblasts. *Proc. Natl. Acad.
Sci. USA*. **110**, E613–E622.
 39. Frisz J.F., Klitzing H.A., Lou K., Hutcheon I.D., We-
ber P.K., Zimmerberg J., Kraft M.L. 2013. Sphingolip-
id domains in the plasma membranes of fibroblasts are
not enriched with cholesterol. *J. Biol. Chem.* **288**,
16855–16861.
 40. Lillemeier B.F., Pfeiffer J.R., Surviladze Z., Wilson B.S.,
Davis M.M. 2006. Plasma membrane-associated pro-
teins are clustered into islands attached to the cytoskel-
eton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 18992–18997.
 41. Pralle A., Keller P., Florin E.L., Simons K., Hörber
J.H. 2000. Sphingolipid–cholesterol rafts diffuse as
small entities in the plasma membrane of mammalian
cells. *J. Cell Biol.* **148**, 997–1008.
 42. Saitov A., Akimov S.A., Galimzyanov T.R., Glasnov T.,
Pohl P. 2020. Ordered lipid domains assemble via con-
certed recruitment of constituents from both mem-
brane leaflets. *Phys. Rev. Lett.* **124**, 108102.
 43. Koukalová A., Amaro M., Aydogan G., Gröbner G.,
Williamson P.T., Mikhalyov I., Hof M., Šachl R. 2017.
Lipid driven nanodomains in giant lipid vesicles are flu-
id and disordered. *Sci. Rep.* **7**, 1–12.
 44. Galimzyanov T.R., Molotkovsky R.J., Bozda-
ganyan M.E., Cohen F.S., Pohl P., Akimov S.A. 2015.
Elastic membrane deformations govern interleaflet
coupling of lipid-ordered domains. *Phys. Rev. Lett.* **115**,
088101.
 45. Galimzyanov T.R., Molotkovsky R.J., Kheyfets B.B.,
Akimov S.A. 2013. Energy of the interaction between

- membrane lipid domains calculated from splay and tilt deformations. *JETP Lett.* **96**, 681–686.
46. Risselada H.J., Marrink S.J. 2008. The molecular face of lipid rafts in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 17367–17372.
47. Perlmutter J.D., Sachs J.N. 2011. Interleaflet interaction and asymmetry in phase separated lipid bilayers: Molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 6563–6577.
48. Pantano D.A., Moore P.B., Klein M.L., Discher D.E. 2011. Raft registration across bilayers in a molecularly detailed model. *Soft Matter.* **7**, 8182–8191.
49. Evans E., Rawicz W. 1990. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phys. Rev. Lett.* **64**, 2094.
50. Pan J., Tristram-Nagle S., Nagle J.F. 2009. Effect of cholesterol on structural and mechanical properties of membranes depends on lipid chain saturation. *Phys. Rev. E.* **80**, 021931.
51. Baumgart T., Das S., Webb W.W., Jenkins J.T. 2005. Membrane elasticity in giant vesicles with fluid phase coexistence. *Biophys. J.* **89**, 1067–1080.
52. Rawicz W., Olbrich K.C., McIntosh T., Needham D., Evans E. 2000. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* **79**, 328–339.
53. Morris C.E., Homann U. 2001. Cell surface area regulation and membrane tension. *J. Membr. Biol.* **179**, 79–102.

Interaction of Ordered Lipid Domain Boundaries and Amphipathic Peptides Regulates Probability of Pore Formation in Membranes

K. V. Pinigin¹, M. V. Volovik^{1,2}, O. V. Batishchev¹, and S. A. Akimov^{1, *}

¹*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

²*Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Moscow oblast, 141700 Russia*

**e-mail: akimov_sergey@mail.ru*

Biological membranes include various lipids. A heterogeneity of lipid composition can lead to phase separation resulting in the formation of ordered lipid domains that differ in lipid composition from the disordered part of the membrane. Membrane deformations that occur at the domain boundary can affect the lateral distribution of various membrane inclusions. In this paper, in the framework of theory of elasticity of lipid membranes, the influence of the boundaries of lipid domains on the lateral distribution of amphipathic peptides adsorbed on the membrane is considered. Such peptides can cause the formation of through pores. It was shown that with an increase in the concentration of amphipathic peptides on the membrane, the peptides first line up near the boundary of the domain parallel to it, thus losing the ability to induce pore formation. Then, as the domain boundary is completely occupied, new peptides stand parallel to the line of peptides that are already at the boundary, at a distance of about 5 nm from the boundary. In this configuration, the probability of formation of through pores in the membrane is increased. Besides, it is shown that the spontaneous curvature of monolayers of the ordered domain and disordered membrane determines the energy of incorporation of peptides into the membrane and their distribution between the phases. However, the spontaneous curvature scarcely influences the interaction of amphipathic peptides with the boundary of the ordered domain.

Keywords: lipid membrane, ordered domains, theory of elasticity, amphipathic peptide, poration

УДК 577.352.4

ВЛИЯНИЕ ИОННЫХ ТОКОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ НА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ ХЛОРОФИЛЛА И ТУШЕНИЕ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ В ХЛОРОПЛАСТАХ *Chara*

© 2020 г. А. А. Булычев^{а, *}, Н. А. Крупенина^а, А. А. Черкашин^а

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия

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

Поступила в редакцию 02.04.2020 г.

После доработки 23.04.2020 г.

Принята к публикации 24.04.2020 г.

Гигантские клетки Characeae, находясь на свету, сочетают возбудимость с неравномерным распределением фотосинтеза и трансмембранных потоков H^+ . Возбуждение плазмалеммы в этих условиях вызывает переходную диссипацию наружных щелочных и кислых зон, а также подавление фотосинтеза в области щелочных зон. После генерации потенциала действия такие клетки проходят через стадию гиперполяризации, которая достигает максимума в течение 1 мин и продолжается до 15 мин. Чтобы исключить участие спонтанных изменений потенциала покоя в ответных реакциях хлоропластов на возбуждение плазмалеммы, в данной работе прослежены изменения флуоресценции хлорофилла, вызываемые короткой деполяризацией в режиме фиксации напряжения. Показано, что для снижения максимальной флуоресценции F_m' и фотосинтетической активности после надпороговой деполяризации необходимо не только развитие входящего Ca^{2+} - и Cl^- -токов, но и стационарное поступление в цитоплазму H^+ (выведение OH^-) до момента приложения электрического стимула. Выявлены различия в амплитуде ионных токов, вызываемых короткой деполяризацией плазмалеммы на свету и в темноте в области наружных щелочных и кислых зон. Результаты согласуются с представлениями о том, что интенсивное поступление H^+ из наружной среды в клетку на свету приводит к понижению рН цитоплазмы. Различия ионных токов в разных частях клетки могут частично определяться наличием множественных инвагинаций плазмалеммы – харасом, специфично локализованных в кислых зонах, а также резкими локальными сдвигами наружного рН в кислых зонах при перфорации клеточной стенки измерительным микроэлектродом.

Ключевые слова: Characeae, фиксация напряжения, флуоресценция хлорофилла, ионные каналы плазмалеммы, транспорт протонов

DOI: 10.31857/S0233475520050047

ВВЕДЕНИЕ

Метаболические процессы, протекающие в разных структурах растительной клетки, тесно сопряжены. Освещенные хлоропласты экспортируют в цитозоль избыток восстановленных продуктов, которые используются в дыхательной цепи митохондрий, а также служат субстратом для NADPH-оксидазы плазматической мембраны. Митохондрии обеспечивают необходимой энергией ионные насосы плазмалеммы, непрерывное движение цитоплазмы и разнообразные реакции биосинтеза. Потенциалозависимые и Ca^{2+} -управляемые ионные каналы наружной мембраны и тонопласта участвуют во внутриклеточной регуляции и сигнализации. Запуск фотосинтеза у ряда растений вызывает возникновение потенциала

действия, который развивается сходным образом на непрерывном свету и в темноте после короткого освещения [1, 2]. Передача сигналов происходит как от тилакоидных мембран к плазмалемме, так и в обратном направлении – от клеточной мембраны к хлоропластам. Например, инициация потенциала действия в клетках харовой водоросли и ловчих листьях насекомоядного растения *Dionaea muscipula* вызывает временное торможение фотосинтеза [3–5].

Влияние потенциала действия на фотосинтетическую активность хлоропластов *Chara* проявлялось особенно сильно в участках клетки с высокой пассивной проводимостью для H^+ или OH^- , формирующих внеклеточные щелочные зоны. При этом оно было слабо выражено в участках с

высокой активностью H^+ -насоса плазмалеммы, где возникают наружные кислые зоны [6, 7]. Сведения об участии Ca^{2+} -токов в возбуждении растительных клеток [8, 9], о влиянии Ca^{2+} на фотосинтез [10, 11], а также о подавлении трансмембранных потоков H^+ после генерации потенциала действия [12, 13] указывают на ключевую роль Ca^{2+} и H^+ в трансформации электрического сигнала плазмалеммы, приводящего к нарушению фотосинтетического потока электронов в хлоропластах. Ионы Ca^{2+} влияют на активность ферментов цикла Кальвина, что сказывается на скорости линейного и циклического потока электронов. Повышение концентрации протонов в тилакоидах и образование трансмембранного градиента рН между люменом и стромой лежит в основе нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла как защитной реакции от избыточного освещения [14]. На рис. 1 схематично показаны потоки H^+ через плазмалемму *Chara*, отвечающие за неоднородный профиль рН на поверхности клетки, а также трансмембранные потоки Ca^{2+} и Cl^- , вызываемые деполяризацией плазмалеммы. Повышение уровня Ca^{2+} в цитоплазме активирует Cl^- каналы плазмалеммы, блокирует проводимость H^+/OH^- -каналов и временно останавливает течение цитоплазмы.

Метод фиксации напряжения служит основным инструментом для изучения ионных токов в клетках растений [9]. Принимая во внимание, что этот метод исключает спонтанные изменения мембранного потенциала, представляется важным использовать его для изучения ионных механизмов регуляции фотосинтеза в возбудимой клетке. Однако такие измерения в силу технических причин долгое время не проводили. Разработка специализированной микрофлуориметрии с модулированным освещением [15] сделала возможным совмещение электродных и флуоресцентных измерений на микроучастках растительной клетки [16].

Результаты данной работы показывают, что короткая (~ 0.25 с) деполяризация плазмалеммы в режиме фиксации напряжения вызывает длительные (в интервале десятков секунд) изменения фотосинтетических параметров, таких как максимальная флуоресценция хлорофилла (F_m'), фактическая флуоресценция на действующем свете (F') и квантовый выход нециклического переноса электронов ($\Delta F/F_m'$). Наряду с известными компонентами мембранного тока (Ca^{2+} - и Cl^- -токи) выявлена минорная компонента входящего тока в щелочной зоне покоящейся клетки, которая ис-

чезает на период ~ 10 мин после импульса деполяризации параллельно с диссипацией щелочной зоны. Формирование и поддержание щелочной зоны отражает стационарный поток H^+ из среды в цитоплазму. Показано, что короткая деполяризация плазмалеммы вызывает резкое снижение F_m' и фотосинтеза лишь при наличии входящего тока H^+ . Инактивация этого тока на период 10–20 мин после надпороговой деполяризации не препятствует развитию Ca^{2+} - и Cl^- -токов, однако исключает подавляющее влияние ионных токов на фотосинтез. Полученные данные говорят о совместном участии Ca^{2+} и H^+ в механизме влияния возбудимости на фотосинтетическую активность, а также указывают на разнонаправленные сдвиги рН цитоплазмы при переходах свет–темнота в участках клетки, расположенных под щелочными и кислыми зонами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали клетки междуузлий водоросли *Chara corallina*, росшие в аквариуме на рассеянном свете при комнатной температуре. Изолированные междуузлия помещали в искусственную прудовую воду, содержащую 0.1 мМ KCl, 1 мМ NaCl и 0.1 мМ $CaCl_2$. В ходе опыта клетку укрепляли в прозрачной камере из оргстекла на столике инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 25-CFL (Zeiss, Германия). Использовали клетки, выдержанные после изоляции не менее суток.

Конструкция трехсекционной измерительной камеры была аналогична модели, описанной в работе [17]. Площадь боковой поверхности клетки в центральном отсеке составляла ~ 0.07 см². Капиллярный микроэлектрод для измерения мембранного потенциала вводили в участок клетки, расположенный в центральном отсеке камеры. Электродом сравнения служил Ag/AgCl-электрод, соединенный с центральным отсеком камеры с помощью солевого мостика. Токвые хлорсеребряные электроды располагались в центральном и боковых отсеках камеры. Измерения переходного тока, вызванного изменением напряжения на мембране, проводили в режиме фиксации потенциала на выделенном рабочем участке клетки длиной 2.5 мм по четырехэлектродной методике [17, 18]. Для фиксации напряжения на мембране использовали специализированный усилитель Dagan 8500 (США). В качестве управляющего и регистрирующего устройства применяли АЦП PCI-6024E (National Instruments, США) в сочетании с программой WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software). Величины тока через анали-

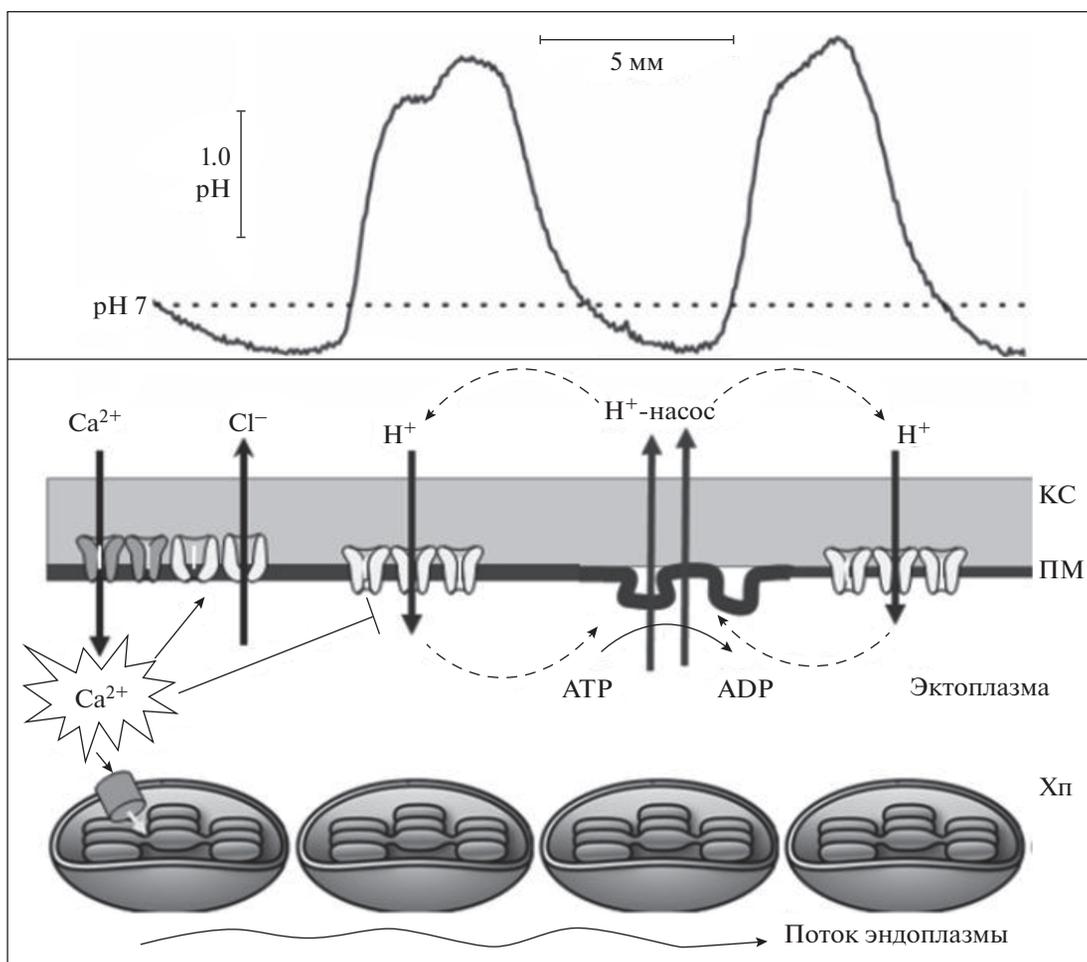


Рис. 1. Схематическое изображение сегмента интернодальной клетки *Chara* и ионных потоков в покое и при возбуждении. Клеточная стенка (КС) создает механическую опору, противодействующую большому перепаду давления. Между плазматической мембраной (ПМ) и слоем хлоропластов (Хп) расположена неподвижная эктоплазма, внутренняя сторона слоя хлоропластов омывается непрерывным потоком эндоплазмы. Текущая цитоплазма отделена от центральной вакуоли тонопластом. На верхней диаграмме показан фрагмент продольного профиля рН у поверхности освещенной клетки. Схема внизу соответствует профилю рН и отражает локализацию наружных кислых и щелочных зон в участках ПМ с активностью H^+ -насоса и с пассивным проведением H^+ , а также круговые электрические токи. Складки ПМ обозначают обогащенные H^+ -АТФ-азой органеллы – харасомы, наиболее многочисленные в области наружных кислых зон. Возбуждение вызывает поступление Ca^{2+} в клетку по потенциал-зависимым каналам ПМ, что повышает уровень $[Ca^{2+}]$ в цитоплазме до 10–40 мкМ и инактивирует H^+ -проводимость ПМ. Возрастание уровня $[Ca^{2+}]$ в цитозоле активирует также выход Cl^- из клетки по Ca^{2+} -зависимым Cl^- -каналам ПМ (входящий Cl^- -ток), а накопление Ca^{2+} в строме Хп при участии светозависимого унипорта подавляет фиксацию CO_2 , что вызывает повышение градиента рН в тилакоидах и энергозависимое тушение флуоресценции хлорофилла *a*.

зируемый участок представлены в абсолютных значениях (мкА) без пересчета на единицу поверхности клетки. Начальный уровень фиксируемого напряжения (V_h) выбирали так, чтобы он был близок к потенциалу покоя.

Параметры флуоресценции хлорофилла *in vivo* определяли на микроучастках диаметром ~100 мкм методом насыщающих импульсов, используя микрофлуориметр Microscopy-PAM (Walz, Германия) с объективом $\times 32/0.4$. Данные представлены в виде изменений максимальной флуорес-

ценции F'_m , индуцируемой насыщающими вспышками, и изменений фактической флуоресценции F' , измеряемой при общем фоновом освещении клетки. Сигнал с фотоумножителя поступал на блок управления (PAM Control Unit) и оцифровывался с помощью АЦП PCI-6024E (National Instruments).

Фоновое освещение всей клетки создавали с помощью верхнего осветителя микроскопа и светофильтра СЗС-22 ($\lambda < 580$ нм). Интенсивность фонового освещения ослабляли с помощью

стеклянных нейтральных светофильтров. В большинстве случаев она составляла 28 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, так как обеспечивала наиболее сильные сдвиги флуоресценции F_m' в ответ на короткую надпороговую деполяризацию. Для индукции переходов между однородным и неоднородным распределением рН на поверхности клетки использовали повышенные интенсивности света ($78 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{с}^{-1}$).

Значения рН на поверхности клетки (pH_0) измеряли с помощью сурьмяных рН-микроэлектродов в стеклянной изоляции с диаметром кончика 5–15 мкм. Измерения pH_0 позволяли отличать области активного выведения H^+ (pH_0 6.2–6.7) и зоны пассивного поглощения H^+ (pH_0 9–9.5). Наличие щелочной зоны у поверхности клетки при нейтральном рН в объеме среды говорит о непрерывном диффузионном потоке H^+ через непроницаемый слой, который равен мембранному потоку H^+ или встречно направленному потоку OH^- . Генератором локальных круговых токов служат кислые зоны, обогащенные H^+ -АТФазой. Замыкаются круговые токи в области щелочных зон, обладающих высокой проводимостью для H^+ или OH^- . Хотя вопрос о природе переносимого иона в щелочных зонах — пассивное поступление в клетку H^+ или выведение из клетки OH^- — еще не решен [19], мы используем один термин “входящий поток H^+ ”. Способность клеток образовывать зоны с высоким и низким рН в центральном отсеке камеры предполагает протекание слабых круговых электрических токов либо в пределах изолированного участка, либо между примыкающими отсеками по водному пространству клеточных стенок. Эти слабые круговые токи, вероятно, были достаточными для образования и поддержания щелочных и кислых областей.

На рисунках показаны результаты, полученные не менее чем в трехкратном воспроизведении на разных клетках. Экспериментальные кривые с доверительными интервалами отражают усредненные данные и стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Токи, отражающие инактивацию $\text{H}^+(\text{OH}^-)$ -проводимости в щелочных зонах

На рис. 2 представлены записи ионного тока, вызванные короткой (240 мс) деполяризацией мембраны от -170 до $+30$ мВ с последующим возвратом к исходному уровню мембранного потенциала, а также вызванные деполяризацией изменения флуоресценции F_m' и F' . Измерения прово-

дили в области наружной щелочной зоны после длительной (20 мин) экспозиции клетки в покое на сине-зеленом свете ($\lambda < 580$ нм) (а, б), а также через 4.5 мин после надпороговой деполяризации, вызывающей снижение проводимости плазмалеммы и диссипацию щелочной зоны [20]. Характерное время развития ионных токов составляет несколько секунд (а, в), а вызванные ими изменения флуоресценции продолжаются в течение 10–20 мин после деполяризующего импульса (б, г).

Как известно, входящий ток включает небольшую кальциевую и преобладающую хлорную составляющие [9, 17]. Амплитуды входящего тока на рис. 2а и 2в были примерно равными, т.е. слабо зависели от состояния пассивной $\text{H}^+(\text{OH}^-)$ -проводимости мембраны. Вместе с тем амплитуда выходящего тока в момент приложения деполяризующего импульса была значительно выше при наличии щелочной зоны, чем в период инактивации пассивного потока H^+ после приложения надпорогового деполяризующего импульса (ср. рис. 2а и 2в). Ранее показано, что высокая проводимость плазмалеммы в области щелочной зоны ($8.3 \pm 1.1 \text{ См м}^{-2}$) снижается примерно в 5 раз в течение первой минуты после генерации потенциала действия и остается почти на таком же низком уровне после 5 мин покоя [20]. Это говорит о том, что повышенная амплитуда выходящего тока на рис. 2а обусловлена высокой проводимостью мембраны при открытых $\text{H}^+(\text{OH}^-)$ -проводящих каналах (“high рН channels” [21, 22]). Высокая проводимость плазмалеммы при щелочных рН среды свойственна клеткам междуузлий *Chara* [21] и *Nitellopsis* [22].

Исходя из этих данных, можно предполагать, что в состоянии покоя через мембрану, лежащую под щелочной зоной, протекает направленный в клетку поток H^+ или выходящий поток OH^- . Соответственно можно ожидать, что инактивация высокой проводимости после остановки этого потока вслед за надпороговой деполяризацией должна проявляться по кинетическим кривым ионных токов.

Приведенные на рис. 2а записи ионных токов представлены на рис. 2б в другом масштабе по амплитуде и времени, что позволяет выявить следовые изменения токов, происходящие после завершения ступенчатой деполяризации. Видно, что деполяризация клетки после длительного (20 мин) периода покоя вызывает развитие тока, который, по-видимому, отражает инактивацию стационарного входящего тока H^+ . Характерное

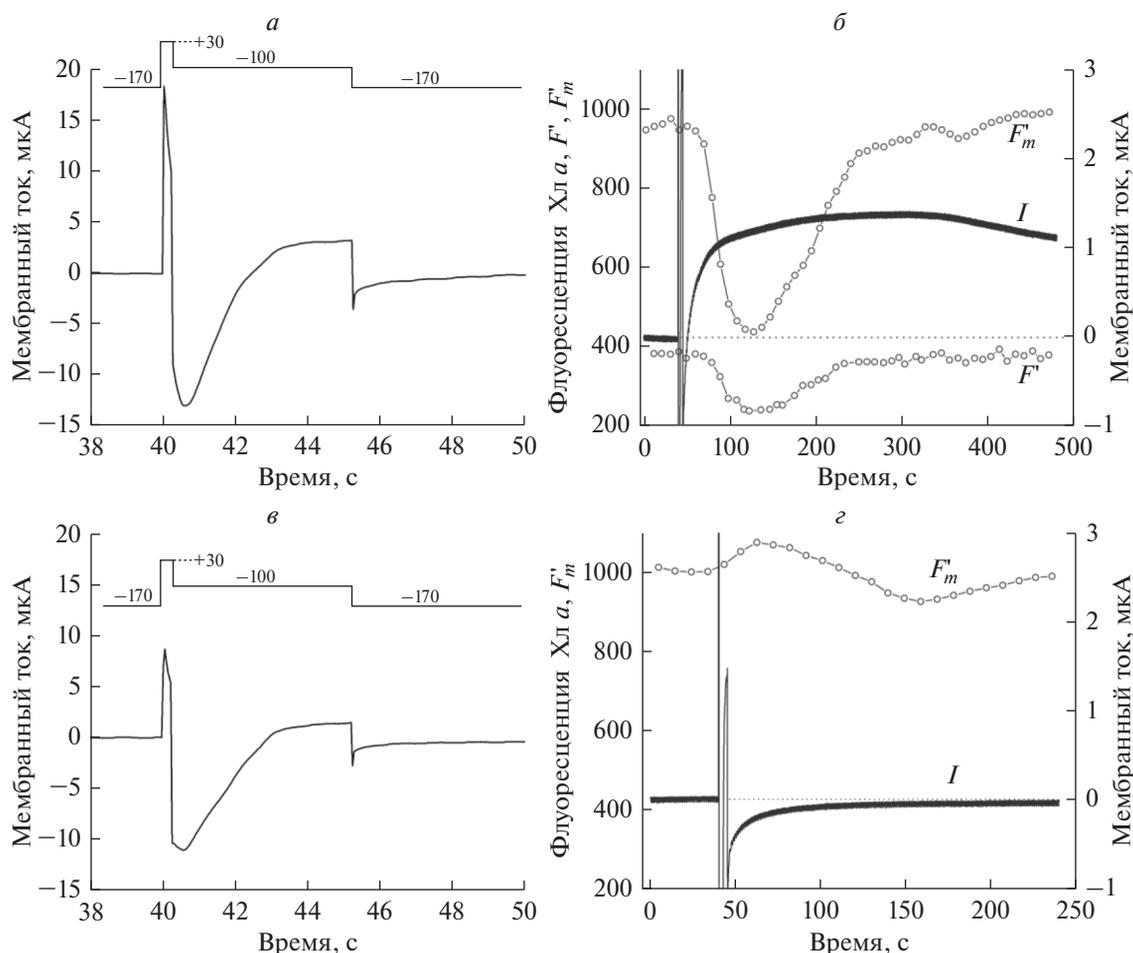


Рис. 2. Ионные токи (*а, в*) плазматической мембраны интернодальной клетки *Chara corallina*, вызванные коротким деполяризующим импульсом (+30 мВ, 240 мс), и последующие изменения фактической (F') и максимальной (F_m') флуоресценции хлорофилла в хлоропластах под наружной щелочной зоной (*б, г*) в том же опыте. *а, б* – После 20 мин инкубации клетки в покое на свету; *в, г* – на свету через 4.5 мин после возбуждения деполяризующим стимулом. Протокол изменения напряжения на мембране представлен на диаграммах в верхней части рис. *2а* и *2в* с указанием командного потенциала для каждой ступени в милливольтках. Исходный стационарный уровень тока принят за ноль.

время нарастания этой компоненты тока (~1 мин) соответствует ранее найденному времени инактивации H^+ -проводящих каналов, вызванной электрическим возбуждением клетки [20]. Амплитуда этой компоненты тока (1.4 мкА) при расчете на единичную площадь составила ~20 мкА см⁻². Это значение соответствует величине входящего тока (20–60 мкА см⁻²) в области щелочных зон у клеток *Chara*, измеренной с помощью вибрирующих микроэлектродов [23]. Для обратного смещения тока к исходному уровню и восстановления щелочной зоны требовалось не менее 15–20 мин инкубации клетки на свету в состоянии покоя. Наряду с инактивацией стационарного входящего тока, деполяризующий импульс вызывал сильное тушение флуоресценции F' и F_m' (рис. *2б*), а также кинетически сходное

уменьшение квантового выхода переноса электронов в фотосистеме II (ФСII) с максимальным снижением параметра $\Delta F/F_m'$ от 0.6 до 0.45 (не показано).

На рис. *2в, 2г* приведены ионные токи и изменения флуоресценции, происходящие на том же участке клетки в условиях, когда деполяризующий импульс был приложен через 4.5 мин после предыдущего электрического стимула. Этот период достаточен для сильного ослабления щелочной зоны. При этом проводимость мембраны опускается до уровня намного ниже нормы [20]. В этом случае отсутствовал следовой ток выходящего направления после импульса деполяризации, а индуцированное тушение флуоресценции F_m' и F' не развивалось. Более того, импульс деполяризации индуцировал небольшое возрастание F_m' , ко-

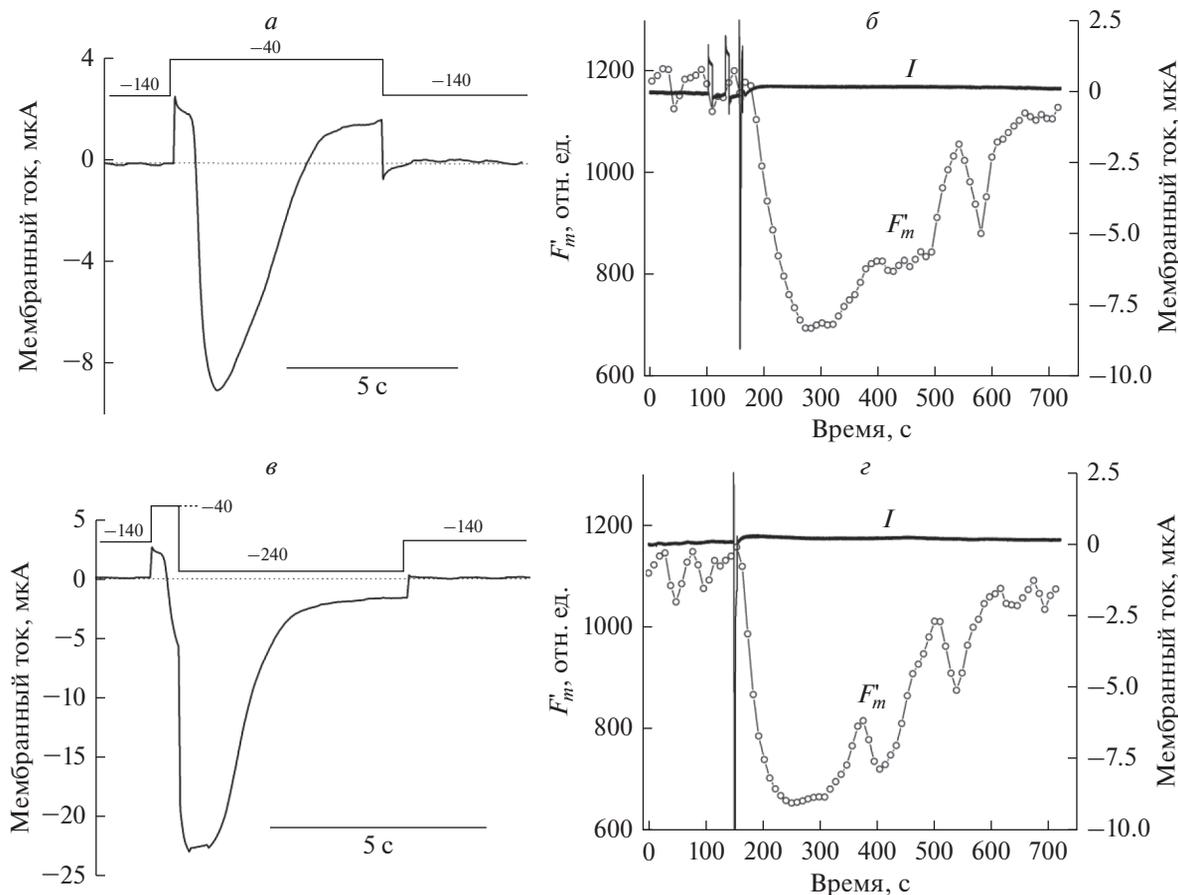


Рис. 3. Повышение амплитуды входящего Cl^- -тока (а, в) не оказывает заметного влияния на амплитуду индуцированного тушения F_m' (б, г). Протоколы изменения фиксируемого напряжения отражены на диаграммах в верхней части рис. 3а и 3в с указанием командного потенциала для каждой ступени в милливольтях. Трехкратное изменение амплитуды Cl^- -тока при смене протокола импульсов (а, в) не сказывалось на уровне нефотохимического снижения F_m' в этом же опыте (б, г).

торое в стандартных условиях опыта маскируется сильным тушением F_m' . Таким образом, хотя параметры входящего тока не претерпели изменений при переходе от длительного к короткому периоду покоя (рис. 2а, 2в), деполяризация плазмалеммы не индуцировала нефотохимического тушения и не снижала квантовую эффективность линейного потока электронов. Это говорит о необходимости входящего потока H^+ для эффективного влияния деполяризации плазмалеммы на фотосинтетическую активность хлоропластов.

Реакция F_m' на деполяризацию не чувствительна к стимуляции Cl^- -тока

Для того чтобы выяснить роль входящего Cl^- -тока в сопряжении деполяризации клетки с подавлением фотосинтеза в хлоропластах под щелочными зонами, были проведены опыты с включением в протокол изменения напряжения до-

полнительного гиперполяризующего импульса, который усиливал выведение Cl^- по Ca^{2+} -активируемым хлорным каналам, повышая тем самым амплитуду входящего тока (рис. 3).

Как видно из рис. 3, кратковременная деполяризация мембраны от -140 до -40 мВ индуцирует сильное снижение флуоресценции F_m' , независимо от амплитуды входящего Cl^- -тока, который возрастал при дополнительной ступени гиперполяризации. На фоне сравнительно высоких концентраций Cl^- в цитоплазме и вакуоли (~ 10 и 100 мМ соответственно [24]), относительные изменения концентрации Cl^- после кратковременной деполяризации, по-видимому, невелики по сравнению с изменениями концентрации Ca^{2+} . Во всяком случае, возможные сдвиги уровня внутриклеточного Cl^- не сказывались на изменениях флуоресценции хлорофилла и квантового выхода реакции ФСII.

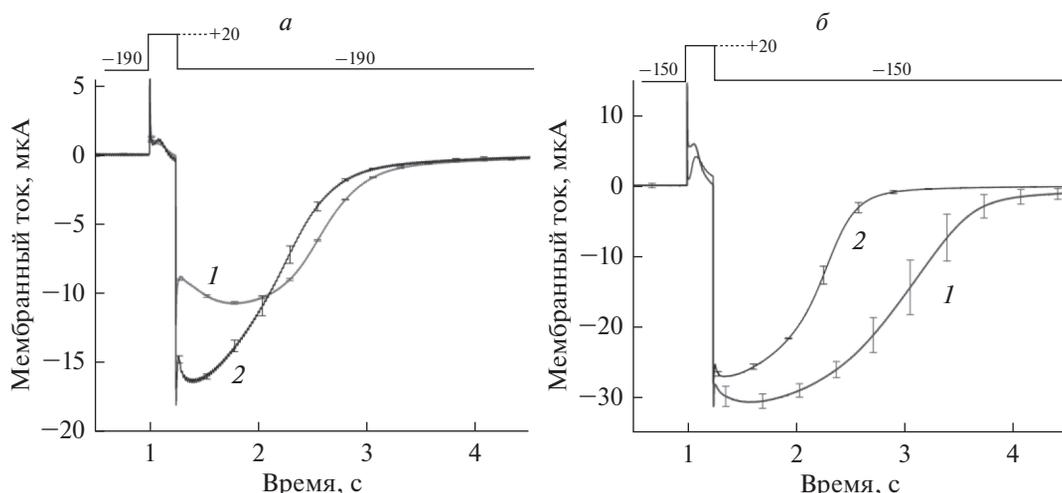


Рис. 4. Вызванные деполяризацией ионные токи в области наружной щелочной (*а*) и кислой (*б*) зоны клеток *Chara*: 1 – на свету ($78 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$); 2 – после 20 мин инкубации клеток в темноте, вызывающей диссипацию щелочных и кислых зон. Представлены усредненные записи и стандартные отклонения среднего, полученные на разных клетках при $n = 3$ (*а*) и $n = 4$ (*б*). Диаграммы в верхней части рисунков отражают протокол изменения напряжения (в милливольтах) на плазматической мембране.

Различия ионных токов в области щелочных и кислых зон

Известно, что проводимость Ca^{2+} -чувствительных хлорных каналов в клетках *Chara* зависит от pH цитоплазмы ($\text{pH}_{\text{ц}}$) [25]. Физиологические различия pH цитоплазмы, вероятно, свойственны участкам клетки, осуществляющим активное выведение протонов и встречно направленное пассивное проведение H^+ [26–29]. Предполагают, что поступление H^+ в клетку понижает $\text{pH}_{\text{ц}}$ под щелочными зонами, а выведение H^+ повышает $\text{pH}_{\text{ц}}$ под кислыми зонами. В связи с этим мы выбирали участки клетки, формирующие наружные щелочные и кислые зоны, и измеряли вызванные деполяризацией переходные токи, отражающие преимущественно потоки Cl^- .

На рис. 4 представлены ионные токи, возникающие в ответ на короткую (240 мс) деполяризацию в области наружной щелочной (*а*) и кислой (*б*) зоны. В ходе опыта клетку поочередно выдерживали 20 мин на сине-зеленом свету ($\lambda < 580 \text{ нм}$, $78 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) для формирования неоднородного профиля pH, а затем 20 мин в темноте для сглаживания неравномерного распределения pH, после чего переходили к новому циклу освещения и затенения.

Амплитуда входящего тока в щелочной зоне на свету (рис. 4*а*, кривая 1) была меньше, чем в той же области после 20 мин темноты (кривая 2). Кроме того, Cl^- -токи в щелочной зоне были меньше, чем пиковые значения Cl^- -тока в кислой

зоне той же клетки (22–25 мкА, не показано). При интерпретации результатов мы учитывали зависимость хлорных токов от pH, обнаруженную в условиях внутриклеточной перфузии [18]. По данным опытов с перфузией в условиях разрушения тонопласта, повышение внутриклеточного pH сопровождается увеличением амплитуды и сокращением длительности инактивации Cl^- -тока [18]. Пониженная амплитуда Cl^- -тока в щелочной зоне на свету (рис. 4*а*, кривая 1) согласуется с предполагаемым сдвигом $\text{pH}_{\text{ц}}$ в сторону кислых значений вследствие интенсивного входящего потока H^+ . Остановка входящего потока после помещения клетки в темноту, вероятно, повышала $\text{pH}_{\text{ц}}$, что приводило к возрастанию Cl^- -тока (рис. 4*а*, кривая 2).

В кислой зоне (рис. 4*б*) влияние освещения и затенения клетки на Cl^- -токи было существенно иным. Максимальная амплитуда Cl^- -тока была отмечена на свету, а затенение клетки приводило к снижению пиковых значений тока. Амплитуды Cl^- -токов в кислой зоне были, как правило, выше, чем в щелочной зоне, причем отличия проявлялись даже при измерениях на кислых и щелочных участках одной и той же клетки. Выявленные различия по амплитуде Cl^- -токов на свету и в темноте согласуются с предполагаемым щелочным смещением $\text{pH}_{\text{ц}}$ в области наружной кислой зоны. Различия по амплитуде Cl^- -токов на рис. 4*а* и 4*б* также соответствуют представлениям о более низкой величине $\text{pH}_{\text{ц}}$ под щелочными зонами по

сравнению с $pH_{\text{ц}}$ под кислыми зонами. Вместе с тем скорости инактивации Cl^- -токов в разных зонах интактных освещенных клеток не проявляли заметной корреляции с их амплитудными значениями в отличие от наблюдений [18] на перфузированных клетках, лишенных тонопласта.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения флуоресценции и фотосинтеза в клетках *Chara* после генерации потенциала действия известны уже давно [3]. Однако все измерения проводились в режиме свободного изменения мембранного потенциала клетки. Вместе с тем известно, что в случае формирования на свету неоднородного продольного профиля pH мембранный потенциал клеток претерпевает длительные изменения после однократного потенциала действия [7]. В этих условиях вслед за потенциалом действия развивалась длительная гиперполяризация с амплитудой 50–60 мВ, причем исходный уровень мембранного потенциала восстанавливался за время ~ 15 мин [7, 20]. Чтобы исключить влияние свободного дрейфа мембранного потенциала на активность хлоропластов, в данной работе использован метод фиксации напряжения. Результаты, представленные на рис. 2 и 3, показывают, что кратковременное деполяризующее смещение мембранного потенциала с последующим восстановлением исходного потенциала вызывает сильные изменения флуоресценции F'_m и F' в хлоропластах, расположенных под наружными щелочными зонами. Эти изменения, равно как и снижение квантового выхода переноса электронов в ФСП ($\Delta F/F'_m$), развивались после некоторой критической деполяризации, достаточной для возникновения входящего тока (см. записи тока и F'_m на рис. 3б).

Качественное сходство изменений флуоресценции в режиме фиксации напряжения и при свободных изменениях мембранного потенциала указывает на то, что основную роль в запуске ответной реакции на электростимул играют события, развивающиеся на плазмалемме в секундном интервале времени, такие как поступление в цитоплазму Ca^{2+} и выход Cl^- [17]. В последнее время выяснилось, что изменения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме фотосинтезирующих клеток *Arabidopsis* при различных воздействиях сопровождаются параллельными изменениями внутриклеточного pH [30], однако механизм такой взаимосвязи пока не установлен. Частично эта связь определяется тем, что Ca^{2+} и H^+ конкурируют за общие участки связывания [31]. Взаимосвязь

уровня Ca^{2+} и pH в цитоплазме представляется важным элементом ионной регуляции фотосинтеза, поскольку энергозависимое тушение F'_m (см. рис. 2, 3) обусловлено накоплением протонов в люмене тилакоидов. Следует также учитывать, что повышение уровня Ca^{2+} в строме хлоропластов при поступлении Ca^{2+} из наружной среды подавляет реакции цикла Кальвина, а это повышает градиент pH на тилакоидной мембране, поскольку снижается потребление АТФ в цикле фиксации CO_2 .

Полученные результаты (рис. 2) показывают, что входящий поток Ca^{2+} является необходимым, но недостаточным условием для развития тушения F'_m и торможения нециклического переноса электронов. Величины Ca^{2+} - и Cl^- -токов были примерно равными в состоянии с максимально активной щелочной зоной (состояние покоя на свету, рис. 2а, 2б) и в условиях ее ослабления после предшествующего деполяризующего импульса (рис. 2в, 2г). Вместе с тем сильное тушение F'_m возникало лишь при условии поддержания щелочной зоны, т.е. при наличии входящего потока H^+ . Это говорит о том, что ответная реакция хлоропластов на повышение уровня Ca^{2+} в цитоплазме зависит от величины $pH_{\text{ц}}$. Можно предполагать, что эта реакция выражена наиболее сильно при пониженных значениях $pH_{\text{ц}}$, которые обусловлены входящим потоком H^+ . Следовые изменения токов, регистрируемых в интервале от 1 мин до 10–15 мин после завершения деполяризующего импульса, согласуются с данными об инактивации H^+ -проводящих каналов (high pH channels) в этом диапазоне времени. Амплитуда следовых токов приближается к оценкам плотности локальных токов в области щелочных зон, выполненным другим методом [23].

В отличие от входящих потоков Ca^{2+} и H^+ , которые необходимы для нефотохимического тушения возбужденных состояний хлорофилла в ответ на деполяризацию плазмалеммы, Ca^{2+} -зависимые потоки Cl^- , по-видимому, играют меньшую роль в этой регуляторной реакции фотосинтеза. Как видно из рис. 3, значительное увеличение амплитуды Cl^- -тока за счет дополнительной ступени гиперполяризации не оказывало влияния на амплитуду изменений флуоресценции F'_m . Наряду с этим, амплитуды Ca^{2+} -активируемого хлорного тока существенно различались в зависимости от проведения измерений в области локализации щелочной или кислой зоны (рис. 4). Эти наблюдения в основном соответствуют сведениям о за-

висимости хлорных токов в перфузируемых клетках от величины рН цитоплазмы [18]. Результаты этой части работы косвенно подтверждают различия рН_ц под щелочными и кислыми зонами освещенных клеток, а именно, пониженные значения рН_ц в участках клетки с преобладанием пассивного входящего потока Н⁺.

На кинетические кривые мембранного тока в щелочных и кислых зонах могут влиять особенности структуры этих частей междоузлий и их ответных реакций на микроукол при введении капиллярного микроэлектрода. Области, расположенные под кислыми зонами *Chara*, содержат большое число харасом — органелл, которые представляют собой разветвленную систему связанных с плазмалеммой канальцев [32], обогащенных содержанием Н⁺-АТФ-азы [33]. Функция харасом, по-видимому, заключается в увеличении эффективной поверхности с активностью Н⁺-насоса плазмалеммы, что способствует поступлению в клетки СО₂, используемого при фотосинтезе. Харасомы практически отсутствуют в частях клетки, формирующих щелочные зоны [33]. В связи с этим эффективные площади поверхности, через которые протекают ионные токи, индуцированные деполяризацией, могут не совпадать для щелочных и кислых зон. По данным работы [34], значения электрической емкости плазмалеммы в области кислых зон были в 1.44 раза выше, чем в области наружных щелочных зон. Эти различия, возможно, обусловлены неравномерным пространственным распределением харасом. Вместе с тем противоположное влияние переходов свет—темнота на ионные токи в щелочных и кислых зонах определяется не харасомами, а лабильностью зон с разными значениями рН, поскольку харасомы представляют собой стабильные структуры и сохраняются на протяжении нескольких суток после помещения клеток в темноту.

Введение стеклянного микроэлектрода в цитоплазму для измерения мембранного потенциала неизбежно сопряжено с микроповреждением клеточной стенки, которое вызывает быстрое локальное образование щелочной зоны, время жизни которой на свету достигает 40 мин [35]. В результате при измерениях мембранного потенциала и ионных токов в области кислой зоны значения наружного рН на анализируемой поверхности могут быть существенно неоднородными и варьировать от рН ~ 6.5 до 9.5—10. Однако радиус щелочной зоны в области микроперфорации не превышает обычно 100 мкм. Поэтому площадь поверхности с измененными значениями

рН составляет крайне малую часть (<1%) в суммарной поверхности выбранного участка клетки и не может существенно исказить получаемые результаты. Сравнение локальных свойств (ионные токи, проводимость) в области щелочных зон, формируемых в интактной клетке на свету и после микроперфорации клеточной стенки, может служить предметом отдельного исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-54-12015).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bulychev A.A., Vredenberg W.J. 1995. Enhancement of the light-triggered electrical response in plant cells following their de-energization with uncouplers. *Physiol. Plant.* **94**, 64–70.
2. Trebacz K., Sievers A. 1998. Action potentials evoked by light in traps of *Dionaea muscipula* Ellis. *Plant Cell Physiol.* **39**, 369–372.
3. Bulychev A.A., Kamzolkina N.A. 2006. Effect of action potential on photosynthesis and spatially distributed H⁺ fluxes in cells and chloroplasts of *Chara corallina*. *Russ. J. Plant Physiol.* **53**, 1–9.
4. Pavlovic A., Demko V., Hudák J. 2010. Trap closure and prey retention in Venus flytrap (*Dionaea muscipula*) temporarily reduces photosynthesis and stimulates respiration. *Ann. Bot.* **105**, 37–44.
5. Krupenina N.A., Bulychev A.A. 2007. Action potential in a plant cell lowers the light requirement for non-photochemical energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* **1767**, 781–788.
6. Bulychev A.A., Kamzolkina N.A., Rubin A.B. 2005. Effect of plasmalemma electrical excitation on photosystem II activity and nonphotochemical quenching in chloroplasts of cell domains in *Chara corallina*. *Dokl. Biochem. Biophys.* **401**, 127–130.
7. Bulychev A.A., Kamzolkina N.A. 2006. Differential effects of plasma membrane electric excitation on H⁺ fluxes and photosynthesis in characean cells. *Bioelectrochemistry.* **69**, 209–215.
8. Williamson R.E., Ashley C.C. 1982. Free Ca²⁺ and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*. *Nature.* **296**, 647–651.
9. Berestovsky G.N., Kataev A.A. 2005. Voltage-gated calcium and Ca²⁺-activated chloride channels and Ca²⁺ transients: Voltage-clamp studies of perfused and intact cells of *Chara*. *Eur. Biophys. J.* **34**, 973–986.
10. Stael S., Wurzinger B., Mair A., Mehlmer N., Vothknecht U.C., Teige M. 2012. Plant organellar calcium signalling: An emerging field. *J. Exp. Bot.* **63**, 1525–1542.
11. Hochmal A.K., Schulze S., Trompelt K., Hippler M. 2015. Calcium-dependent regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1847**, 993–1003.
12. Bulychev A.A., Kamzolkina N.A., Luengviriyi J., Rubin A.B., Müller S.C. 2004. Effect of a single excitation

- stimulus on photosynthetic activity and light-dependent pH banding in *Chara* cells. *J. Membr. Biol.* **202**, 11–19.
13. Krupenina N.A., Bulychev A.A., Roelfsema M.R.G., Schreiber U. 2008. Action potential in *Chara* cells intensifies spatial patterns of photosynthetic electron flow and non-photochemical quenching in parallel with inhibition of pH banding. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 681–688.
 14. Ruban A.V., Johnson M.P., Duffy C.D.P. 2012. The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochim. Biophys. Acta.* **1817**, 167–181.
 15. Goh C.H., Schreiber U., Hedrich R. 1999. New approach of monitoring changes in chlorophyll *a* fluorescence of single guard cells and protoplasts in response to physiological stimuli. *Plant, Cell Environ.* **22**, 1057–1070.
 16. Bulychev A.A., Cherkashin A.A., Rubin A.B., Vredenberg W.J., Zyk V. S., Müller S.C. 2001. Comparative study on photosynthetic activity of chloroplasts in acid and alkaline zones of *Chara corallina*. *Bioelectrochemistry.* **53**, 225–232.
 17. Lunevsky V.Z., Zherelova O.M., Vostrikov I.Y., Berestovsky G.N. 1983. Excitation of Characeae cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels. *J. Membr. Biol.* **72**, 43–58.
 18. Катаев А.А. 2008. Функциональные свойства Ca^{2+} -активируемых хлорных каналов харовых водорослей. *Дисс. канд. биол. наук*. Пушкино: Институт биофизики клетки РАН. 117 с.
 19. Beilby M.J., Al Khazaaly S. 2009. The role of H^+/OH^- channels in the salt stress response of *Chara australis*. *J. Membr. Biol.* **230**, 21–34.
 20. Bulychev A.A., Krupenina N.A. 2009. Transient removal of alkaline zones after excitation of *Chara* cells is associated with inactivation of high conductance in the plasmalemma. *Plant Signal. Behav.* **4**, 727–734.
 21. Beilby M.J., Bisson M.A. 1992. *Chara* plasmalemma at high pH: Voltage dependence of the conductance at rest and during excitation. *J. Membr. Biol.* **125**, 25–39.
 22. Beilby M.J., Mimura T., Shimmen T. 1993. The proton pump, high pH channels, and excitation: Voltage clamp studies of intact and perfused cells of *Nitellopsis obtusa*. *Protoplasma.* **175**, 144–152.
 23. Lucas W.J., Nuccitelli R. 1980. HCO_3^- and OH^- transport across the plasmalemma of *Chara*. *Planta.* **150**, 120–131.
 24. Coster H.G.L. 1966. Chloride in cells of *Chara australis*. *Aust. J. Biol. Sci.* **19**, 545–554.
 25. Johannes E., Crofts A., Sanders D. 1998. Control of Cl^- efflux in *Chara corallina* by cytosolic pH, free Ca^{2+} , and phosphorylation indicates a role of plasma membrane anion channels in cytosolic pH regulation. *Plant Physiol.* **118**, 173–181.
 26. Bulychev A.A., Komarova A.V. 2014. Long-distance signal transmission and regulation of photosynthesis in characean cells. *Biochemistry (Moscow).* **79**, 273–281.
 27. Feijó J.A., Sainhas J., Hackett G.R., Kunkel J.G., Hepler P.K. 1999. Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. *J. Cell Biol.* **144**, 483–496.
 28. Bulychev A.A., Komarova A.V. 2017. Photoregulation of photosystem II activity mediated by cytoplasmic streaming in *Chara* and its relation to pH bands. *Biochim. Biophys. Acta.* **1858**, 386–395.
 29. Bulychev A.A., Krupenina N.A. 2019. Interchloroplast communications in *Chara* are suppressed under the alkaline bands and are relieved after the plasma membrane excitation. *Bioelectrochemistry.* **129**, 62–69.
 30. Behera S., Zhaolong X., Luoni L., Bonza M.C., Doccula F.G., De Michelis M.I., Morris R.J., Schwarzländer M., Costa A. 2018. Cellular Ca^{2+} signals generate defined pH signatures in plants. *Plant Cell.* **30**, 2704–2719.
 31. Plieth C., Sattelmacher B., Hansen U.P. 1997. Cytoplasmic Ca^{2+} – H^+ -exchange buffers in green algae. *Protoplasma.* **198**, 107–124.
 32. Franceschi V.R., Lucas W.J. 1980. Structure and possible function(s) of charasomes; complex plasmalemma-cell wall elaborations present in some characean species. *Protoplasma.* **104**, 253–271.
 33. Schmölder P.M., Höftberger M., Foissner I. 2011. Plasma membrane domains participate in pH banding of *Chara* internodal cells. *Plant Cell Physiol.* **52**, 1274–1288.
 34. Chilcott T.C., Coster H.G.L. 1999. Electrical impedance tomography study of biological processes in a single cell. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **873**, 269–286.
 35. Bulychev A.A., Alova A.V., Bibikova T.N. 2013. Strong alkalinization of *Chara* cell surface in the area of cell wall incision as an early event in mechanoperception. *Biochim. Biophys. Acta.* **1828**, 2359–2369.

Influence of Plasma Membrane Ion Currents on Chlorophyll Fluorescence and Quenching of Excited States in *Chara* Chloroplasts

A. A. Bulychev¹, *, N. A. Krupenina¹, and A. A. Cherkashin¹

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

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

In light-exposed giant cells of characean algae, the membrane excitability is combined with an uneven distribution of photosynthesis and transmembrane H^+ fluxes. The excitation of plasmalemma under these condi-

tions results in the transient dissipation of external alkaline and acid zones and inhibits photosynthesis in the alkaline zones. The generation of action potential in these patterned internodes is followed by cell hyperpolarization that peaks in 1 min and lasts up to 15 min. In order to exclude the influence of drifting resting potential on the chloroplast response to plasma membrane excitation, the voltage clamp mode was applied in this work, and chlorophyll fluorescence changes caused by a short depolarizing pulse were monitored. The depolarizing shift of membrane potential under voltage clamp conditions was found to induce a large depression of F_m , chlorophyll fluorescence and photosynthetic activity, provided that inward Ca^{2+} and Cl^- currents were triggered and that a steady-state inward H^+ flux (or OH^- efflux) was maintained before the application of an electric stimulus. The depolarization-induced ion currents measured in the alkaline and acidic cell regions under light and in darkness were found to differ significantly. The results are consistent with the notion that the massive inward H^+ inflow occurring under illumination in the alkaline cell regions is associated with the acidic shift of cytoplasmic pH. Distinct amplitudes of ionic currents in different cell parts can be partially determined by the presence of numerous plasmalemmal invaginations, charasomes specifically localized in the acidic zones, as well as by sharp local changes in external pH in acidic zones during the perforation of cell wall with a measuring microelectrode.

Keywords: Characeae, voltage clamp, chlorophyll fluorescence, plasma membrane ion channels, proton transport

УДК 577.25;612.1;577.1

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВИРОВАННЫМ ПРОТЕИНОМ С И ПЕПТИДОМ-АГОНИСТОМ PAR1 ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВАЦИИ КЛЕТОК ЛИНИИ RBL-2H3

© 2020 г. И. И. Бабкина^{a, b, *}, Е. В. Киселева^c, Л. Р. Горбачева^{a, b}

^aМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119991 Россия

^bРоссийский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, 117997 Россия

^cИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия

*e-mail: irinababkina92@gmail.com

Поступила в редакцию 16.04.2019 г.

После доработки 05.02.2020 г.

Принята к публикации 10.02.2020 г.

Настоящее исследование посвящено проблеме регуляции провоспалительной активности тучных клеток через специфический класс рецепторов, активируемых протеазами – PAR. В работе впервые продемонстрирована регуляция новым пептидом-агонистом PAR1 (NPNDKYERF-амид) активности клеток RBL-2H3, аналогов тучных клеток. Показано, что пептид-агонист PAR1, подобно активированному протеину С (АПС), проявляет противовоспалительное и цитопротекторное действие на RBL-2H3 при их активации провоспалительными стимулами. Инкубация тучных клеток с липополисахаридом (ЛПС) вызывает транзиторное увеличение концентрации внутриклеточного свободного кальция, повышает уровень секреции гистамина клетками, снижает их пролиферацию. Предварительная инкубация клеток как с пептидом, так и с АПС предотвращает эффект эндотоксина. Активация RBL-2H3 тромбином и кальциевым ионофором приводит к реорганизации актина, что может свидетельствовать об активации клеток и запуске секреции. Обработка клеток как пептидом, так и АПС на фоне действия активаторов приводит к упорядочиванию актина в подмембранной области клеток, что характерно для контрольной группы. Таким образом, впервые обнаруженные противовоспалительные и протекторные свойства пептида-агониста PAR1 открывают возможность поиска новых подходов к терапии воспалительных процессов на основе препаратов пептидной природы через модулирование активности рецепторов семейства PAR.

Ключевые слова: пептид-агонист рецептора, активируемого протеазами, активированный протеин С, воспаление, клетки линии RBL-2H3

DOI: 10.31857/S0233475520040039

ВВЕДЕНИЕ

В развитие и исход процессов воспаления активно вовлечены протеазы системы свертывания крови, в частности тромбин и активированный протеин С (АПС). В связи с этим одной из фундаментальных проблем физиологии является понимание механизмов вовлечения протеаз гемостаза в воспалительные и репаративные процессы в тканях. Тромбин и АПС регулируют внутриклеточные каскады через специфический класс рецепторов, активируемых протеазами – PAR. Показано, что тромбин и АПС, взаимодействуя с одним и тем же рецептором – PAR1, оказывают разнонаправленное действие при эксайтотоксичности и воспалении [1, 2]. Данный тип взаимо-

действия был назван “смещенный агонизм” [3–5]. Кроме того, агонистами PAR могут быть синтетические пептиды с аминокислотной последовательностью аналогичной “привязанному лиганду”, освобождаемому при расщеплении рецептора протеазой, и имеющие разные последовательности в случае активации тромбином или АПС [6–8]. Таким образом, исследование роли ключевых протеаз гемостаза, а также рецепторов, активируемых протеазами, в воспалительных процессах представляется весьма актуальным и перспективным как для фундаментальной физиологии, так и для практической медицины. Поиск новых агонистов PAR – регуляторов воспаления может быть перспективным направлением поиска

соединений, эффективно купирующих воспалительные процессы. Одними из основных участников воспалительного процесса являются тучные клетки (ТК). Они экспрессируют ПАР и содержат целый ряд медиаторов воспаления, однако механизмы взаимодействия протеаз системы гемостаза с тучными клетками изучены недостаточно. В связи с этим целью исследования было выяснение механизмов противовоспалительного действия АПС и его функционального аналога, синтетического пептида-агониста ПАР1 (АП9) в условиях воспаления *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследований использовали клеточную линию RBL-2H3 – культивируемый аналог тучных клеток, полученную из периферической крови крыс с базофильной лейкемией [9, 10].

Материалы. Активированный протеин С, тромбин человека, персульфат аммония (PSA), диметилсульфоксид (DMSO), ортофталевый альдегид, гистамин, липополисахарид из *E. coli* (ЛПС), ионофор А23187, ингибиторы протеаз и фосфатаз, лизирующий буфер RIPA (Sigma, США), Na_3PO_4 , NaCl, KCl, CaCl_2 , MgCl_2 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NEPES, параформальдегид, инактивированная эмбриональная телячья сыворотка (HI FBS), раствор Хенкса без кальция и без магния (Ca^{2+} , Mg^{2+} -free HBSS), трипсин-EDTA, L-глутамин, пенициллин/стрептомицин, GlutaMax (Gibco, Invitrogen, США); МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий-бромид), EGTA, иономицин, Тритон X-100, Fura-2/AM, Syto59, DAPI, Pluronic F-127 (Molecular Probes, США); антитела: первичные анти-ThrombinR (анти-ПАР1) антитела (АТАР2, С18, SantaCruz, США), анти-GAPDH антитела (Millipore, США); вторичные антитела AlexaFluor 488, AlexaFluor 555 (Molecular Probes); раствор Версена, среда α -МЕМ (Панэко, Россия); реагент Бредфорд, трис-буферный солевой раствор (TBS) (Bio-Rad, США); хемилюминисцентный набор ECL (Thermo Scientific, США).

Синтез пептида-агониста ПАР1 (АП9) (NPNDKYEPF-амид) был осуществлен в лаборатории синтеза пептидов ФГБУ “Российский кардиологический научно-производственный комплекс” Минздрава РФ М.В. Сидоровой по стандартной технологии пептидного синтеза на твердой фазе с применением методологии Fmoc (9-флуоренилметоксикарбонил). Структура пептида подтверждена данными ^1H -ЯМР-спектро-

скопии, а гомогенность – данными аналитической ВЭЖХ.

Клеточная культура RBL-2H3. В работе были использованы культивируемые аналоги тучных клеток – клетки линии RBL-2H3. Эта линия клеток была получена из крыс линии Вистар с химически индуцированной базофильной лейкемией. Данные клетки экспрессируют рецепторы Fc ϵ RI и способны секретировать гистамин. Клетки обладают способностью к дегрануляции, т.е. к высвобождению ряда веществ, связанных с иммунными реакциями. Клетки линии RBL-2H3 были предоставлены ИБР РАН.

Клетки выращивали на культуральных флаконах 25 см² в среде α -МЕМ, содержащей 0.5 мМ L-глутамин, 10% HI FBS и 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина. Пассирование клеток осуществляли с использованием раствора Версена и 0.05% трипсина-EDTA 1 раз в 3 дня. Для экспериментов клетки культивировали на 96- и 48-луночных планшетах (по 5×10^4 и 8×10^4 клеток/луночка соответственно) или на чашках Петри Glass Bottom (MatTek, США) (по 8×10^4 клеток/стекло) при 37°C и 5% CO_2 . Воздействия исследуемыми веществами осуществляли через 24 ч после нанесения клеточной суспензии на культуральные планшеты или чашки Петри.

Иммуноцитохимическое окрашивание. Клетки, культивируемые на чашках Петри Glass Bottom (MatTek, США), промывали теплым фосфатно-солевым буфером (PBS) и фиксировали в 4% параформальдегиде (15 мин). После отмывки (1×10 мин 120 мМ Na_2HPO_4 ; 1×10 мин низкосолевым буфером (150 мМ NaCl, 10 мМ Na_2HPO_4), 2×10 мин высокосолевым буфером (0.5 М NaCl, 20 мМ Na_2HPO_4)) клетки пермеабелизовали и для блокирования неспецифического связывания инкубировали в буфере FSBB, содержащем 0.1% Тритон X-100, 5% FBS (эмбриональная телячья сыворотка), в PBS. Первичные анти-ThrombinR антитела (АТАР2, С18) инкубировали с клетками в течение ночи при 4°C в FSBB. На следующий день культуры трижды отмывали от первичных антител высокосолевым буфером, затем в течение 1.5 ч инкубировали со вторичными антителами. Для оценки реорганизации F-актина клетки инкубировали с фаллоидином (1 : 40), конъюгированным с Alexa 488. Далее клетки промывали (1×10 мин высокосолевым буфером (0.5 М NaCl, 20 мМ Na_2HPO_4); 1×10 мин 120 мМ Na_2HPO_4 ; 1×10 мин 5 мМ Na_2HPO_4). Для визуализации ядер к клеткам добавляли ДНК-тропный краситель Syto59 или DAPI (1 : 500), разведенные в 5 мМ NaH_2PO_4 . Далее клетки анализировали с

помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (ZEISS, Германия).

Вестерн-блоттинг. Для подтверждения данных иммуноцитохимии экспрессию рецептора PAР1 оценивали при помощи метода вестерн-блоттинга. Культуральные чашки Петри с клетками линии RBL-2H3 переносили на лед, 1 раз отмывали холодным фосфатно-солевым буфером. Затем клетки лизировали с использованием буфера RIPA, содержащего ингибиторы протеаз и фосфатаз (Sigma). Лизаты собирали, инкубировали 30 мин и далее центрифугировали при 14000 об/мин, 4°C в течение 10 мин. Супернатанты аккуратно отбирали, измеряли содержание белка с помощью реагента Бредфорд (Bio-Rad), замораживали и хранили при -70°C. При проведении ПААГ-электрофореза аликвоту лизата каждой группы добавляли к соответствующему объему буфера (12.5 mM Tris/HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% глицерин, 0.025% бромфеноловый синий, 20% β-меркаптоэтанол, pH 6.8) и наносили в лунки геля. После разделения белков в ПААГ осуществляли перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану при 20 В, 0.4 А в течение часа. Мембрану блокировали (5% обезжиренное сухое молоко в TBS) и затем инкубировали с первичными антителами к PAР1 (1 : 100, Santa Cruz, США) в течение ночи при +4°C на шейкере. Далее несвязавшиеся антитела отмывали, мембрану инкубировали со вторичными HRP-антителами в течение 1.5 ч. После отмывки мембрану проявляли на пленку, используя хемилюминесцентный набор ECL (Thermo Scientific). Далее мембрану инкубировали в растворе Stripping Buffer (Thermo Scientific) в течение 30 мин, отмывали, блокировали и инкубировали с анти-GAPDH антителами (1 : 300, Millipore, США) с последующей детекцией, как указано выше.

Определение пролиферации RBL-2H3 (МТТ-тест). Основа МТТ-метода при оценке содержания живых клеток в культуре – восстановление клетками солей тетразолия до сильно поглощающих в видимой области спектра формазапов [11]. МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолийбромид) восстанавливается до формаза дегидрогеназами митохондрий только живых клеток. Водный раствор МТТ добавляли в культуральную среду до конечной концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали клетки 2 ч при 37°C, 5% CO₂. Растворение формазапов осуществляли с помощью DMSO (Sigma). Оптическую плотность измеряли на фотометре iMark (Bio-Rad) при 530 нм. Оценивали результаты в процентах по отношению к контролю.

Измерение секреции гистамина клетками линии RBL-2H3. Для индукции секреции гистамина клетки линии RBL-2H3 инкубировали с исследуемыми веществами 90 мин при 37°C, 5% CO₂. Реакцию останавливали помещением планшета на лед. Анализ экстраклеточного гистамина проводили в клеточном супернатанте. Для определения внутриклеточного гистамина клетки разрушали 15-минутной инкубацией с 0.1% раствором Тритона X-100. Метод определения гистамина основан на реакции конденсации гистамина с ортофталевым альдегидом, в результате которой образуется флуоресцирующий комплекс. Для определения содержания гистамина к пробам добавляли 1 N NaOH и 0.1% раствор ортофталевого альдегида в 96% этаноле. Образовавшийся флуорофор стабилизировали подкислением раствора 3N HCl [12, 13]. Флуоресценцию измеряли на планшетном спектрофлуориметре Multilabel counter 1420, VICTOR2 PerkinElmer при 460 нм, возбуждая при 355 нм.

Для определения количества секретируемого гистамина клетками строили калибровочную кривую (5; 2; 1; 0.8; 0.6; 0.45; 0.3; 0.15 мкг/мл гистамина).

Для каждой отдельной пробы рассчитывали долю высвободившегося гистамина в процентах. Высвобождение гистамина (%) = (концентрация гистамина в супернатанте)/(концентрация гистамина в супернатанте + концентрация внутриклеточного гистамина) × 100%. Уровень секреции гистамина клетками в разных условиях (при воздействии тестируемых веществ) выражали в процентах от уровня секреции гистамина клетками контрольной группы (спонтанная секреция), принятого за 100%.

Микрофлуориметрические измерения [Ca²⁺]_i. [Ca²⁺]_i измеряли методом флуоресцентной микроскопии с помощью высокоаффинных Ca²⁺-индикаторов Fluo-4 и Fura-2 (Molecular Probes) [14].

Перед экспериментом клетки нагружали ацетоксиметильным (AM) эфиром индикатора Fura-2 или Fluo-4 в культуральной среде в течение 40 мин при 37°C в CO₂-инкубаторе, добавляя индикаторы в концентрациях 1–2 мкМ. Для облегчения проникновения индикаторов сквозь клеточную мембрану загрузку осуществляли в присутствии “мягкого” неионного детергента Pluronic F-127 (0.02%) (Molecular Probes), затем клетки отмывали HEPES-солевым буфером и выдерживали в нем 10–15 мин для полной деэтерификации молекул индикатора.

Стекло с клетками помещали на столик лазерного сканирующего микроскопа LSM 700

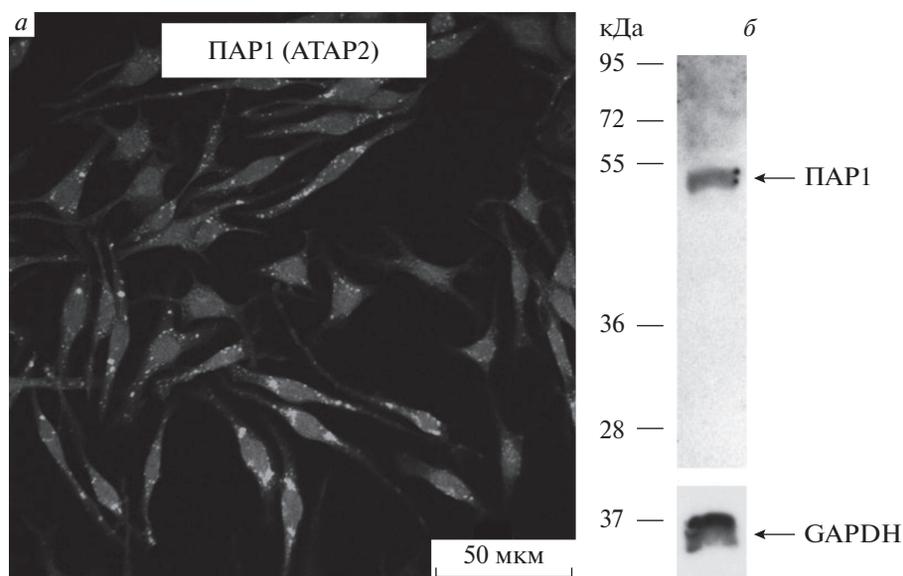


Рис. 1. Экспрессия ПАР1 в клетках линии RBL-2H3. Репрезентативные данные иммуноцитохимического окрашивания (а) и вестерн-блота (б). ПАР1 (АТАР2) – специфические анти-ПАР1-антитела, GAPDH – антитела к анти-глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназе.

(ZIESS, Германия) в случае использования Fluo-4 или Olimpus (любезно предоставленного ФГАУ “НМИЦ здоровья детей”, Минздрава России) при регистрации кальциевого сигнала с помощью Fura-2. Флуоресценцию Fura-2 возбуждали, облучая клетки поочередно светом с длинами волн 340 и 380 нм в течение 100–200 мс, с интервалом 5–10 с; эмиссию регистрировали в диапазоне 505–535 нм. Флуоресценцию Fluo-4 возбуждали, облучая клетки светом с длиной волны 488 нм в течение 100–200 мс, с интервалом 10–13 с; эмиссию регистрировали в диапазоне 505–535 нм. Данные Ca^{2+} -зависимой флуоресценции представлены в виде относительных значений, полученных в результате нормирования флуоресцентного сигнала в каждой клетке на эффект иономицина, принятый за единицу.

Статистическая обработка данных. Обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., США). Для анализа использовали данные 4–6 независимых экспериментов. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Для анализа использовали параметрический критерий One-way ANOVA и непараметрические критерии Краскела–Уоллеса (Kruskal–Wallis test) и Манна–Уитни (Mann–Whitney test). Различия считали достоверными при $p < 0.05$, n – число независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Антивоспалительное и пролиферативное действие агонистов ПАР1 – АПС и АП9 на клетки линии RBL-2H3, активированные липополисахаридом

Для исследования антивоспалительного действия активированного протеина С (АПС) и нового пептида-агониста ПАР1 – АП9 были использованы клетки линии RBL-2H3 базофильной лейкемии крыс. Они экспрессируют широкий спектр рецепторов и отвечают активацией и повышением секреции на действие провоспалительных/повреждающих стимулов подобно тучным клеткам, что делает их удобным объектом для исследования воспалительных процессов.

Ряд данных зарубежных и отечественных исследователей указывает на вовлечение в АПС-зависимую регуляцию клеточных функций ПАР1 и эндотелиального рецептора протеина С (ЭРПС) [2, 6, 7]. Используя вестерн-блотинг и иммуноцитохимическое окрашивание клеток линии RBL-2H3, с помощью специфических анти-ПАР1 антител мы установили, что RBL-2H3 экспрессируют указанный тип рецепторов (рис. 1). Данный факт позволяет предположить возможность рецептор-опосредованной регуляции клеточных функций протеазой АПС и ее функциональным аналогом пептидом АП9. Ранее в нашей лаборатории была показана ПАР1-зависимая реализация эффектов АП9 на тучных клетках из перитоне-

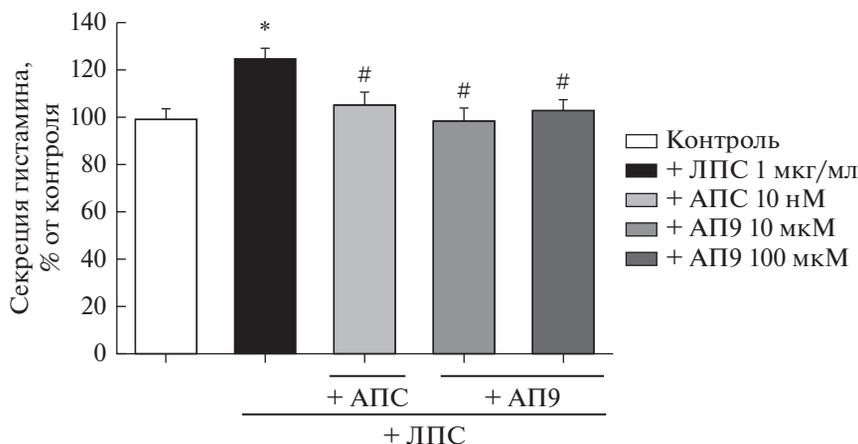


Рис. 2. Влияние АПС (10 нМ) и АП9 (10 и 100 мкМ) на секрецию гистамина клетками линии RBL-2H3, активированными провоспалительным агентом – ЛПС (1 мкг/мл). В качестве контроля выступали неактивированные клетки без АПС или АП9, $n = 4$. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем, # $p < 0.05$ по сравнению с клетками, активированными ЛПС, но без добавления АПС и АП9.

ниальной полости крыс и гиппокампальных нейронах [15–17].

Влияние АПС и АП9 на секрецию гистамина клетками линии RBL-2H3, вызванную липополисахаридом. ЛПС является широко используемым индуктором воспаления в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Показано, что с помощью TLR4 тучные клетки распознают ЛПС и секретируют во внешнюю среду провоспалительные факторы IL-1, IL-6 и TNF α [18]. Кроме того, запуск ЛПС сигнальных каскадов в тучных клетках сопряжен с активацией транскрипционного фактора NF- κ B и последующей секрецией провоспалительных цитокинов [19]. При активации тучных клеток провоспалительными стимулами происходит дегрануляция и секреция медиаторов во внеклеточную среду [20]. Уровень дегрануляции может служить маркером активации тучных клеток и интенсивности воспалительного процесса. В настоящем исследовании нами показано, что инкубация клеток линии RBL-2H3 с ЛПС (1 мкг/мл, 90 мин) приводит к увеличению секреции гистамина на 26% по сравнению с контрольной группой (рис. 2). Обнаружено, что предобработка клеточных культур АПС (10 нМ) или АП9 (10 и 100 мкМ) способствует снижению уровня дегрануляции на 20, 26 и 22% соответственно по сравнению с группой активированных, но не обработанных протекторами клеток (рис. 2). Полученные данные впервые демонстрируют противовоспалительный эффект АПС и АП9 на клетках линии RBL-2H3 в условиях активации ЛПС. Согласно литературным данным, цитопротекторный эффект АПС осуществляется через вовлечение β -аррестина независимо от G-белков [21, 22].

В связи с этим, возможным механизмом протекторного действия АПС на клетки линии RBL-2H3 является запуск сигнальных каскадов с привлечением β -аррестина [23] и стабилизацией подмембранного цитоскелета.

Влияние АПС и АП9 на выживаемость клеток линии RBL-2H3 в условиях действия эндотоксина. Активация тучных клеток в условиях воспаления может приводить не только к повышению их секреторной активности, но и сопровождаться клеточной гибелью. В наших исследованиях мы оценивали число живых клеток с помощью МТТ-теста при действии эндотоксина ЛПС (1 мкг/мл).

В процессе развития острой воспалительной реакции, вызванной инкубацией клеток в присутствии ЛПС в течение 24 ч, наблюдалось снижение уровня живых клеток в культуре. Установлено, что инкубация клеток с ЛПС приводит к снижению данного показателя на 30%. Предобработка клеток АПС (10 нМ) или АП9 (10 мкМ) предотвращала ЛПС-вызванную гибель клеток, в результате доля живых клеток не отличалась от контрольных значений. Необходимо отметить, что пролиферация клеток RBL-2H3, обработанных АПС или АП9, не отличалась от пролиферации клеток контрольной группы (рис. 3).

Активация RBL-2H3, вызванная эндотоксином, сопровождается снижением пролиферации и активацией секреции. АП9, подобно АПС, защищает клетки, снижая уровень секреции и приводя к нормализации процесса пролиферации.

Таким образом, агонисты PАР1 – АПС и АП9 защищают клетки линии RBL-2H3 от токсического воздействия эндотоксина.

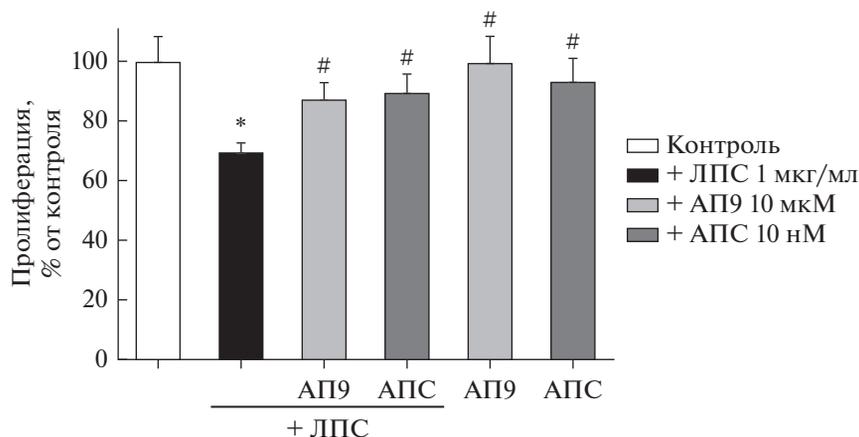


Рис. 3. Влияние АПС (10 нМ) и АП9 (10 мкМ) на выживаемость клеток линии RBL-2H3, активированных ЛПС (1 мкг/мл). В качестве контроля выступали неактивированные и не обработанные исследуемыми веществами клетки, $n = 4$. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем, # $p < 0.05$ по сравнению с клетками, активированными ЛПС, но без добавления АПС и АП9.

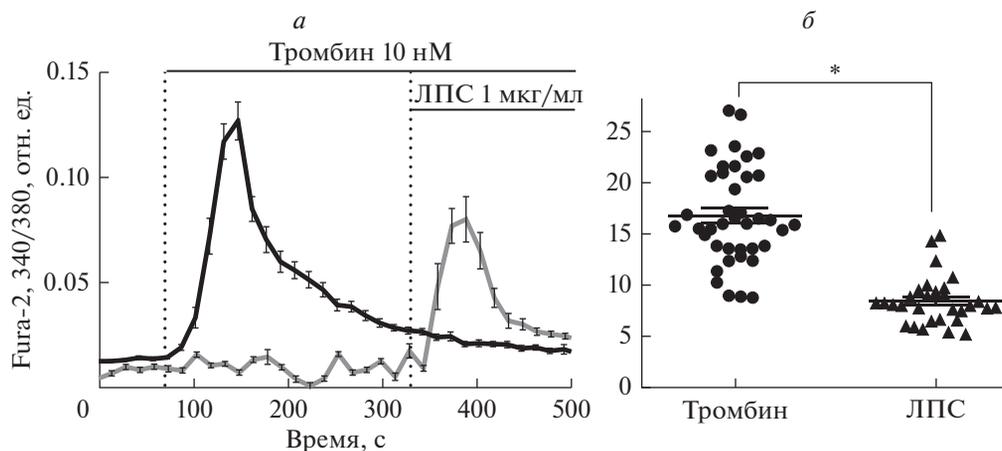


Рис. 4. Влияние тромбина (10 нМ) и ЛПС (1 мкг/мл) на изменение внутриклеточной концентрации кальция в культуре клеток линии RBL-2H3. *а* – Изменение Ca^{2+} -зависимой флуоресценции высокоаффинного кальциевого индикатора Fura-2 во времени. *б* – Площадь под кривой Ca^{2+} -зависимой флуоресценции высокоаффинного кальциевого индикатора Fura-2 во времени (отн. ед. \times с). $n = 60 \pm 10$. * $p < 0.05$ по сравнению с тромбином.

2. Влияние провоспалительной активации клеток линии RBL-2H3 тромбином и липополисахаридом на концентрацию свободного внутриклеточного кальция

Возрастание концентрации ионов кальция является ключевым фактором, опосредующим многие внутриклеточные процессы и, в частности, активацию клеток. Ранее на клетках линии RBL-2H3 было показано, что развитие воспалительной реакции сопровождается увеличением концентрации цитозольного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) [24]. На уровень внутриклеточного Ca^{2+} может дозозависимо влиять сериновая протеаза гемостаза – тромбин, которая в высоких концентрациях вы-

ступает в качестве провоспалительного фактора. Известно, что тромбин в высоких концентрациях через PAR1 активирует перитонеальные тучные клетки, вызывая их дегрануляцию [25]. Вместе с тем и ЛПС (1 мкг/мл) стимулирует дегрануляцию клеток и способствует FcεRI-зависимой мобилизации Ca^{2+} через SOCс (Store-Operated Ca^{2+} Channels), влияя на экспрессию и транскрипцию субъединиц этих каналов [24]. При активации тучных клеток происходит повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, связанное с его выходом из эндоплазматического ретикула, ведущее к истощению этого депо Ca^{2+} и инициирующее вход Ca^{2+} через SOCс плазматической мембраны. Все это приводит к увеличению

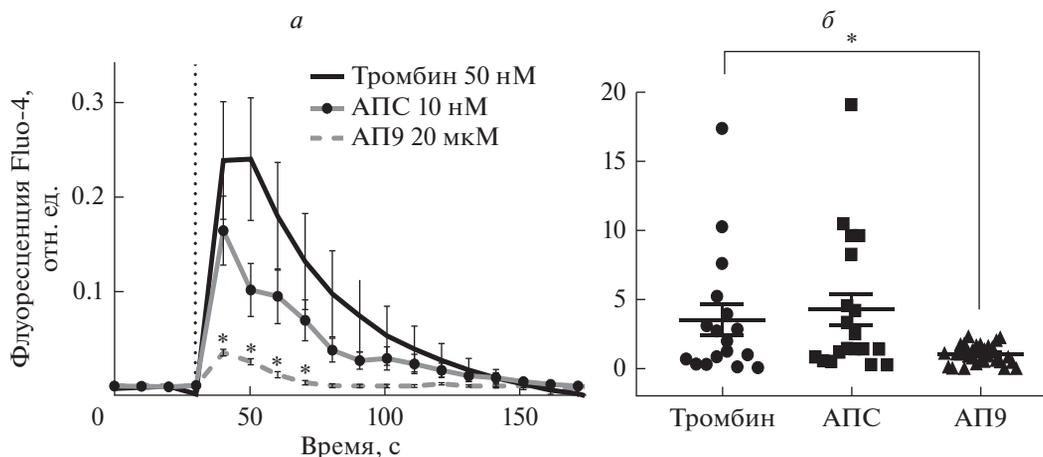


Рис. 5. Влияние АПС (10 нМ) и АП9 (20 мкМ) на изменение внутриклеточной концентрации кальция в культуре клеток линии RBL-2H3, при активации их тромбином (50 нМ). *а* – Изменение Ca^{2+} -зависимой флуоресценции высокоаффинного кальциевого индикатора Fluo-4 во времени. *б* – Площадь под кривой Ca^{2+} -зависимой флуоресценции высокоаффинного кальциевого индикатора Fluo-4 во времени (отн. ед. \times с). $n = 80 \pm 5$. * $p < 0.05$ по сравнению с тромбином.

$[\text{Ca}^{2+}]_i$, что является существенным для сигнальных каскадов клетки [26–28].

Тромбин (10 нМ) вызывает транзиторное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в RBL-2H3, имеющее сходную конфигурацию с ответом клеток на ЛПС, но более выраженное по амплитуде (о чем свидетельствует размер площади под графиком, рис. 4б), чем при добавке эндотоксина (рис. 4). На рис. 4а видно, что вызванное ЛПС изменение Ca^{2+} -зависимой флуоресценции Fura-2 отменяется предварительной инкубацией клеток с тромбином. Вероятно, это связано с трансдукцией сигналов, запускаемых тромбином через G_q -белок при расщеплении ПАР1 и активируемых ЛПС TLR4 через фосфоинозитидный путь с образованием вторичного мессенджера IP3, приводящего к выходу кальция из эндоплазматического ретикулума [29–31]. Можно предположить, что к моменту добавления ЛПС (на фоне тромбина) запасы Ca^{2+} истощены или инактивированы механизмы его высвобождения в цитозоль.

Обнаруженное нами возрастание $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках RBL-2H3 под действием тромбина может быть одним из механизмов протеаза-зависимой активации клеток, что согласуется с данными, полученными в нашей лаборатории о провоспалительном действии тромбина [25, 32].

На следующем этапе мы оценивали влияние АПС и АП9 на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в RBL-2H3. АПС и АП9 не влияли на $[\text{Ca}^{2+}]_i$, что согласуется с ранее полученными нами данными на культивируемых гиппокампаальных нейронах [33]. При этом 10-минутная предобработка клеток линии RBL-2H3 в

присутствии АП9 приводила к существенному уменьшению амплитуды Ca^{2+} -ответа, вызванного тромбином (рис. 5). Интересно, что АПС не обладал столь выраженным действием в этих условиях (рис. 5). Возможно, протекторный механизм действия синтетического пептида АП9 связан с запуском β -аррестин-зависимого сигнального каскада, который, как показано ранее, вызывает эффект, противоположный G-белок-зависимому действию тромбина [21, 22].

3. Влияние АПС и АП9 на перестройку актинового цитоскелета, вызванную провоспалительной активацией клеток RBL-2H3

Активация иммунокомпетентных клеток сопровождается запуском секреции, что сопряжено с перестройкой актинового цитоскелета [34]. Данный процесс, например, в макрофагах опосредован нарастанием Ca^{2+} в цитозоле, в присутствии которого актин-связывающий белок гельзолин вызывает фрагментацию актиновых филаментов [35]. Существуют данные о том, что кальмодулин также играет важную роль в Ca^{2+} -зависимой разборке F-актина в клетках RPMC [36]. В активированных клетках RBL-2H3 кальмодулин концентрировался в богатом актином кортексе (подмембранной области) клетки [37], где взаимодействовал с актин-связывающим каркасным белком IQGAP1. Rho GTP-азы высвобождаются из IQGAP1, когда кальмодулин связывает Ca^{2+} . Поэтому повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ инициирует разборку существующего актинового кортекса клетки, устраняя тем самым физическую прегра-

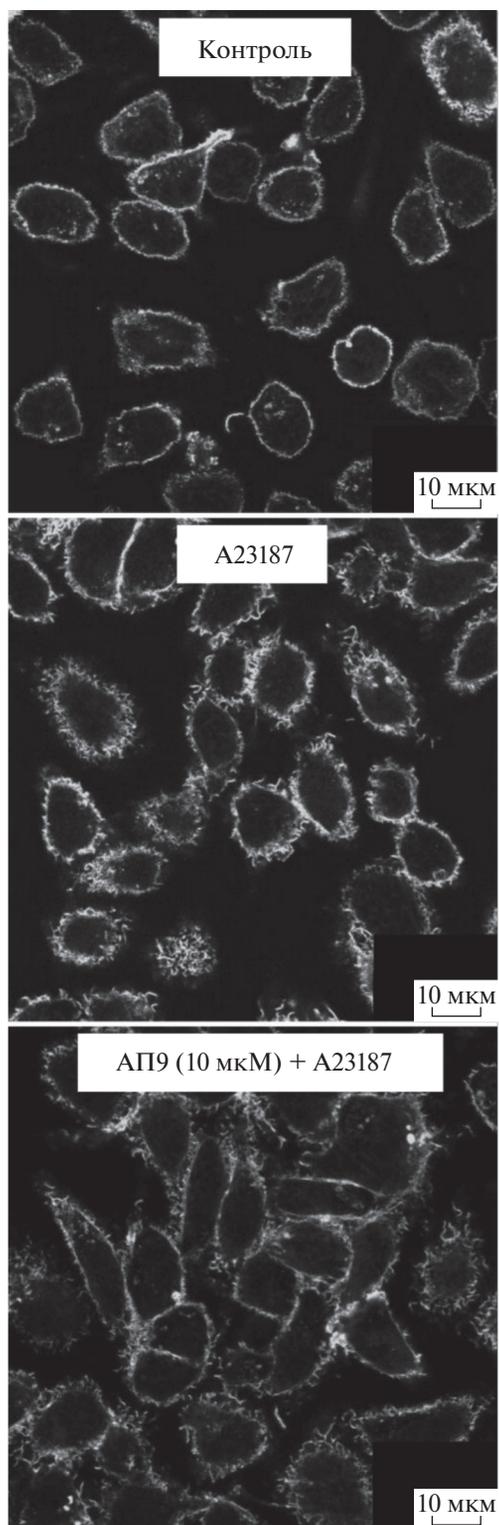


Рис. 6. Влияние АП9 (10 мкМ) на изменение актинового цитоскелета клеток линии RBL-2H3 через 24 ч после их активации ионофором А23187 (50 нМ). Репрезентативные снимки соответствующих клеточных культур, полученные с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700.

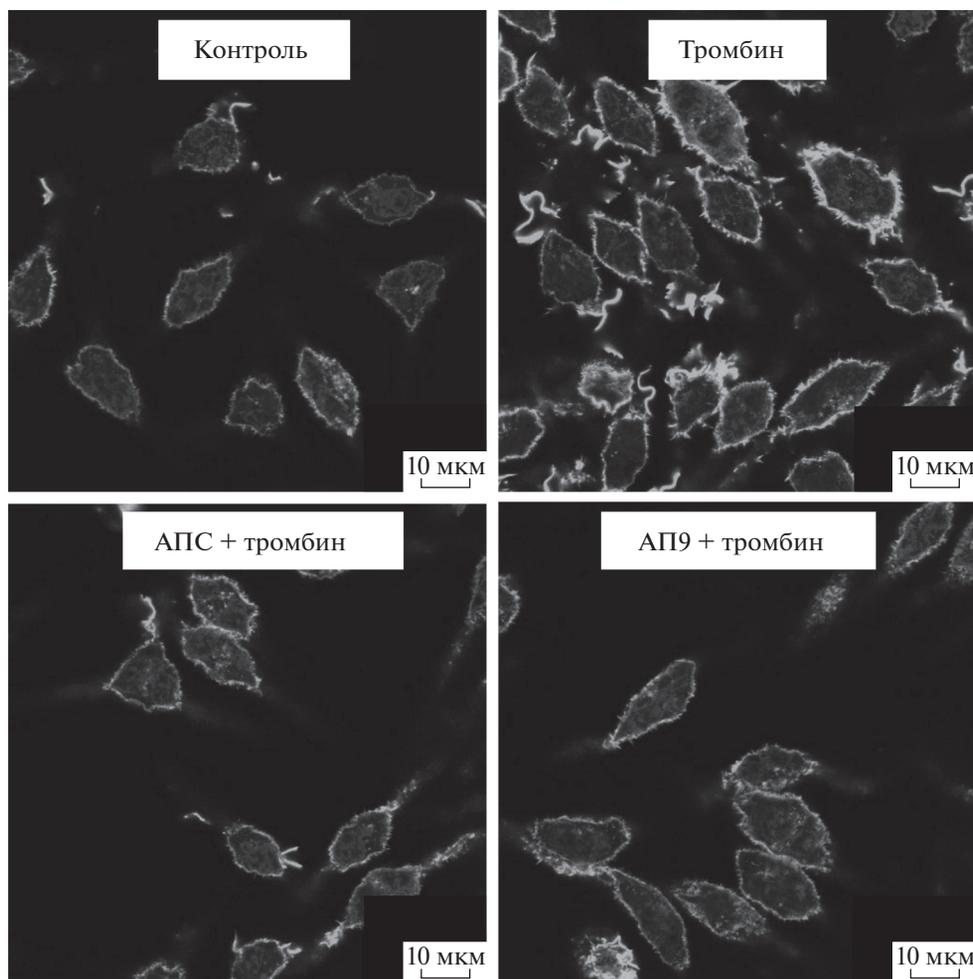


Рис. 7. Влияние АПС (10 нМ) и АП9 (10 мкМ) на изменение актинового цитоскелета клеток линии RBL-2H3, активированных тромбином (50 нМ). Репрезентативные снимки соответствующих клеточных культур, полученные с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700.

ду для слияния везикул с плазматической мембраной [38].

В следующей серии экспериментов мы активировали клетки тромбином (50 нМ, 1.5 ч) или кальциевым ионофором A23187 (50 нМ, 24 ч) и затем с помощью фаллоидина оценивали состояние F-актина в клетках линии RBL-2H3 в присутствии исследуемых ПАР1-агонистов (рис. 6 и 7). Тромбин в высокой концентрации и ионофор A23187 однонаправленно изменяли структуру актинового цитоскелета клеток, обеспечивая перестройку актина, характерную для экзоцитоза (рис. 6 и 7). При этом актиновые филаменты смещаются в околядерную зону из подмембранной области отростков. Схожие перестройки кортикального F-актина наблюдаются после стимуляции FcεR1 тучных клеток и интерпретируются во многих исследованиях как важный шаг в облегчении слияния гранул с плазматической мембра-

ной, необходимого для высвобождения их содержимого во внеклеточную среду [34, 39–42]. Подобные изменения, вероятно, опосредованы взаимодействием тромбина с ПАР1 и усилением сигнала через активацию RhoA, что приводит к перестройке цитоскелета в клетках [43]. Это согласуется с данными, полученными на культуре астроцитов, где тромбин в высоких концентрациях вызывал изменение актинового цитоскелета, в частности повышение количества стресс-фибрилл в клетках [32]. Кроме того, подобная реорганизация цитоскелета может быть следствием тромбин-опосредованного повышения внутриклеточного Ca^{2+} и запуском Ca^{2+} -зависимых сигнальных каскадов через актин-регулирующие белки, РКCs и др. При этом предобработка клеток АП9 или АПС способствовала стабилизации цитоскелета подобно ситуации, наблюдаемой в контрольной группе (рис. 6 и 7). Аналогичный эффект АПС

был продемонстрирован на астроцитах, где он снижал вызванную тромбином дезорганизацию фибрилл и образование “free fields” [32].

Таким образом, на линии клеток RBL-2H3 впервые продемонстрировано вовлечение в регуляцию воспалительного ответа агонистов PAR1. Выявленный противовоспалительный эффект нового пептида-агониста PAR1, функционального аналога АПС, предоставляет новую возможность поиска препаратов пептидной природы с комплексным противовоспалительным действием.

Авторы приносят искреннюю благодарность А.М. Сурину (ФГАУ “НМИЦ здоровья детей” Минздрава России) за ценные замечания и рекомендации, сделанные в ходе обсуждения результатов.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-015-00529. Работа Е.В. Киселевой выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН, № 0108-2019-0004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zlokovic B.V. 2011. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer’s disease and other disorders. *Nature Rev. Neurosci.* **12**, 723–738.
- Mosnier L.O., Zlokovic B.V., Griffin J.H. 2014. Cytoprotective-selective activated protein C therapy for ischaemic stroke. *Thromb. Haemost.* **112** (11), 883–892.
- Russo A, Soh U.J, Paing M.M, Arora P, Trejo J. 2009. Caveolae are required for protease-selective signaling by protease-activated receptor-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 6393–6397.
- Grimsey N., Soto A.G., Trejo J. 2011. Regulation of protease-activated receptor signaling by posttranslational modifications. *IUBMB life.* **63** (6), 403–411.
- Austin K.M., Covic L., Kuliopulos A. 2013. Matrix metalloproteases and PAR1 activation. *Blood.* **21** (3), 431–439.
- Gorbacheva L., Davidova O., Sokolova E., Ishiwata S., Pinelis V., Strukova S., Reiser G. 2009. Endothelial protein C receptor is expressed in rat cortical and hippocampal neurons and is necessary for protective effect of activated protein C at glutamate excitotoxicity. *J. Neurochem.* **111** (4), 967–75.
- Mosnier L.O., Sinha R.K., Burnier L., Bouwens E.A., Griffin J.H. 2012. Biased agonism of protease-activated receptor 1 by activated protein C caused by non-canonical cleavage at Arg46. *Blood.* **120** (26), 5237–5246.
- Hollenberg M.D., Mihara K., Polley D., Suen J.Y., Han A., Fairlie D.P., Ramachandran R. 2014. Biased signalling and proteinase-activated receptors (PARs): Targeting inflammatory disease. *Br. J. Pharmacol.* **171** (5), 1180–1194.
- Eccleston E., Leonard B.J., Lowe J.S., Welford H.J. 1973. Basophilic leukaemia in the albino rat and a demonstration of the basopoietin. *Nat. New Biol.* **133** (244), 73–76.
- Kulczycki A.J., Isersky C., Metzger H. 1974. The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. I. Evidence for specific binding of IgE. *J. Exp. Med.* **3** (139), 600–616.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**, 55–63.
- Shore P.A. 1971. The chemical determination of histamine. In: *Methods of Biochemical Analysis: Analysis of Biogenic Amines and Their Related Enzymes*. Ed. Glick D. New York: Wiley Interscience, p. 89–92.
- Shore P.A., Burkhalter A., Cohn V.H.Jr. 1959. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **127**, 182–186.
- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260** (6), 3440–3450.
- Бабкина И.И., Струкова С.М., Пинелис В.Г., Райзер Г., Горбачева Л.Р. 2016. Новый синтетический пептид защищает нейроны от гибели, вызванной токсическим воздействием активированных тучных клеток, через рецептор, активируемый протеазами. *Биол. мембраны.* **33** (1), 70–79.
- Киселева Е.В., Сидорова М.В., Горбачева Л.Р., Струкова С.М. 2014. Пептид-агонист рецептора, активируемого протеазами, стимулирует пролиферацию кератиноцитов и заживление раны эпителиального пласта подобно активированному протеину С. *Биомед. химия.* **60** (6), 702–706.
- Горбачева Л.Р., Киселева Е.В., Савинкова И.Г., Струкова С.М. 2017. Новая концепция действия протеаз гемостаза на процессы воспаления, нейротоксичности и регенерации тканей. *Биохимия.* **82** (7), 1018–1032.
- Цибулькина В.Н., Цибулькин Н.А. 2017. Тучная клетка как полифункциональный элемент иммунной системы. *Аллергология и иммунология в педиатрии.* **2** (49).
- Nizamutdinova I.T., Dusio G.F., Gasheva O.Y., Skoog H., Tobin R., Peddaboina C., Meininger C.J., Zawieja D.C., Newell-Rogers M.K., Gashev A.A. 2016. Mast cells and histamine are triggering the NF-κB-mediated reactions of adult and aged perilymphatic mesenteric tissues to acute inflammation. *Aging (Albany NY).* **8** (11), 3065.
- da Silva E.Z.M., Jamur M.C., Oliver C. 2014. Mast cell function: A new vision of an old cell. *J. Histochem. Cytochem.* **62** (10), 698–738.
- Schulte G., Shenoy S.K. 2011. Beta-arrestin and disheveled coordinate biased signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108** (50), 19839–19840.
- Wisler J.W., Xiao K., Thomsen A.R., Lefkowitz R.J. 2014. Recent developments in biased agonism. *Curr. Opin. Cell Biol.* **27**, 18–24.
- Soh U.J., Trejo J. 2011. Activated protein C promotes protease activated receptor 1 cytoprotective signaling

- through β arrestin and dishevelled 2 scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 1372–1380.
24. Yang C., Mo X., Lv J., Liu X., Yuan M., Dong M., Li L., Luo X., Fan X., Jin Z., Liu Z., Liu J. 2012. Lipopolysaccharide enhances Fc ϵ RI-mediated mast cell degranulation by increasing Ca²⁺ entry through store-operated Ca²⁺ channels: Implications for lipopolysaccharide exacerbating allergic asthma. *Exp. Physiol.* **12** (97), 1315–1327.
 25. Strukova S.M., Dugina T.N., Khlgatian S.V., Redkozubov A.E., Redkozubova G.P., Pinelis V.G., 1996. Thrombin-mediated events implicated in mast cell activation. *Semin. Thromb. Hemost.* **22**, 145–150.
 26. Dráber P., Sulimlenko V., Dráberová E., 2012. Cytoskeleton in mast cell signaling. *Front. Immunol.* **3**, 130.
 27. Blank U., Rivera J. 2004. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol.* **25** (5), 266–273.
 28. Rivera J., Fierro N.A., Olivera A., Suzuki R. 2008. New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE. *Adv. Immunol.* **98**, 85–120.
 29. Coughlin S.R., 2000. Thrombin signaling and protease activated receptors. *Nature*. **407**, 258–264.
 30. Tauseef M., Knezevic N., Chava K.R., Smith M., Sukriti S., Gianaris N., Obukhov A.G., Vogel S.M., Schraufnagel D.E., Dietrich A., Birnbaumer L. 2012. TLR4 activation of TRPC6-dependent calcium signaling mediates endotoxin-induced lung vascular permeability and inflammation. *J. Exp. Med.* **209** (11), 1953–1968.
 31. Chiang C.Y., Veckman V., Limmer K., David M. 2012. Phospholipase C γ -2 and intracellular calcium are required for lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor 4 (TLR4) endocytosis and interferon regulatory factor 3 (IRF3) activation. *J. Biol. Chem.* **287** (6), 3704–3709.
 32. Иванова А.Е., Горбачева Л.Р., Струкова С.М., Пинелис В.Г., Райзер Г. 2013. Участие активированного протеина С и тромбина в регуляции функций астроцитов. *Биол. мембраны*. **30** (5–6), 387–397.
 33. Gorbacheva L.R., Storozhevykh T.P., Pinelis V.G., Davydova O.N., Ishivata S., Strukova S.M. 2008. Activated protein C via the PAR1 receptor regulates the survival of neurons under glutamate excitotoxicity. *J. Biochemistry*. **73** (6), 893–902.
 34. Deng Z., Zink T., Chen H.Y., Walters D., Liu F.T., Liu G.Y., 2009. Impact of actin rearrangement and degranulation on the membrane structure of primary mast cells: A combined atomic force and laser scanning confocal microscopy investigation. *Biophys. J.* **96** (4), 1629–1639.
 35. Sun H.Q., Lin K.M., Yin H.L. 1997. Gelsolin modulates phospholipase C activity *in vivo* through phospholipid binding. *J. Cell. Biol.* **138** (4), 811–820.
 36. Sullivan R., Burnham M., Torok K., Koffer A. 2000. Calmodulin regulates the disassembly of cortical F-actin in mast cells but is not required for secretion. *Cell Calcium*. **28**, 33–46.
 37. Psatha M., Koffer A., Erent M., Moss S.E., Bolsover S. 2004. Calmodulin spatial dynamics in RBL-2H3 mast cells. *Cell Calcium*. **36**, 51–59.
 38. Psatha M., Razi M., Koffer A., Moss S.E., Sacks D.B., Bolsover S.R. 2007. Targeting of calcium: Calmodulin signals to the cytoskeleton by IQGAP1. *Cell Calcium*. **41**, 593–605.
 39. Frigeri L., Apgar J.R. 1999. The role of actin microfilaments in the down-regulation of the degranulation response in RBL-2H3 mast cells. *J. Immunol.* **162**, 2243–2250.
 40. Nielsen E.H., Braun K., Johansen T. 1989. Reorganization of the subplasmalemmal cytoskeleton in association with exocytosis in rat mast cells. *Histol. Histopathol.* **4**, 473–477.
 41. Narasimhan V., Holowka D., Baird B. 1990. Microfilaments regulate the rate of exocytosis in rat basophilic leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 222–229.
 42. Oka T., Hori M., Tanaka A., Matsuda H., Karaki H., Ozaki H. 2004. IgE alone-induced actin assembly modifies calcium signaling and degranulation in RBL-2H3 mast cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **286**, 256–263.
 43. Soh U.J., Dores M.R., Chen B., Trejo J., 2010. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br. J. Pharmacol.* **160** (2), 191–203.

Regulation of the Proinflammatory Activity of the RBL-2H3 Cells by Activated Protein C and Peptide-Agonist of Protease-Activated Receptor 1 (PAR1)

I. I. Babkina^{1,2,*}, E. V. Kiseleva³, L. R. Gorbacheva^{1,2}

¹Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, Moscow, 119991 Russia

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

³Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: irinababkina92@gmail.com

The present study is focused on the problem of regulation of the proinflammatory activity of mast cells through a specific class of protease-activated receptors, PAR1. Here we show for the first time that a new peptide-agonist of PAR1 regulates the activity of the mast cells analog, cell line RBL-2H3. The peptide-agonist of PAR1, like activated protein C (APC), exerts anti-inflammatory and cytoprotective effects on RBL-2H3

cells, when they are activated by proinflammatory factors. Incubation of mast cells with lipopolysaccharide (LPS) induces a transient increase in the intracellular concentration of free calcium ions, enhances the histamine secretion, and suppresses cell proliferation. Pretreatment of the cells with the peptide or APC prevents the effect of endotoxin. Activation of the RBL-2H3 cells by thrombin and calcium ionophore leads to actin reorganization, which may indicate cell activation and secretion onset. Application of the peptide or APC in the presence of activators leads to the actin ordering in the cell submembrane region, which is typical for the control group. Thus, the newly discovered anti-inflammatory and protective properties of the peptide-agonist of PAR1 (NPNDKYEPF-amide) open up the possibility of finding new approaches to the therapy of inflammatory processes on the basis of peptide drugs through the modulation of the PAR activity.

Keywords: activated protein C (APC), protease-activated receptor 1 (PAR1), peptide-agonist of PAR1, inflammation, cell line RBL-2H3

УДК 577.352.465

КЛЕТОЧНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА С ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫМИ СЕНСОРАМИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО И РЕТИКУЛЯРНОГО КАЛЬЦИЯ

© 2020 г. П. Д. Котова^а, *, О. А. Рогачевская^а

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

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

Поступила в редакцию 05.03.2020 г.

После доработки 19.05.2020 г.

Принята к публикации 21.05.2020 г.

Ионы кальция являются универсальным вторичным посредником и регулируют множество внутриклеточных процессов. Многие агонисты и первичные посредники, вовлеченные в межклеточные коммуникации и аутокринные/паракринные регуляции, действуют через поверхностные рецепторы, сопряженные с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} . Существующие представления о механизмах внутриклеточной Ca^{2+} -сигнализации основаны преимущественно на мониторинге Ca^{2+} в цитозоле. Между тем обмен Ca^{2+} между цитозолем и различными клеточными органеллами имеет ключевое значение для физиологии клеток и биологических тканей в целом. Поэтому мониторинг Ca^{2+} -сигналов в различных компартментах клетки представляется необходимым для анализа различных аспектов внутриклеточной Ca^{2+} -сигнализации. До последнего времени внутриклеточную Ca^{2+} -сигнализацию исследовали с помощью синтетических Ca^{2+} -зондов, которые невозможно избирательно загрузить в клеточные компартменты, вовлеченные в поддержание Ca^{2+} -гомеостаза, включая цитозоль, эндоплазматический ретикулум, митохондрии, кислые лизосомы. Поэтому специфические для компартментов Ca^{2+} -сигналы идентифицировали за счет использования Ca^{2+} -зондов с различной аффинностью к Ca^{2+} в сочетании с пермеабиллизацией плазматической мембраны клеток. В последние годы были разработаны генетически кодируемые Ca^{2+} -индикаторы, представляющие собой Ca^{2+} -чувствительные флуоресцентные белки, одним из основных преимуществ которых является возможность локализации в определенных органеллах. В настоящей работе описано получение моноклональных клеточных линий, экспрессирующих одновременно флуоресцентные сенсоры цитоплазматического Ca^{2+} GEM-GECO1 и ретикулярного Ca^{2+} R-CEPIA1er. Полученные клоны могут быть использованы как клеточная система для анализа сопряжения поверхностных рецепторов с внутриклеточной Ca^{2+} -сигнальной системой и для изучения механизмов регуляции выброса депонированного Ca^{2+} .

Ключевые слова: генетически кодируемые сенсоры Ca^{2+} , внутриклеточная Ca^{2+} -сигнализация, культура клеток

DOI: 10.31857/S0233475520050072

ВВЕДЕНИЕ

Ионы кальция являются универсальным внутриклеточным вторичным посредником, регулирующим множество жизненно важных процессов, включая сокращение клеток, их рост, синаптическую передачу, экспрессию генов. Благодаря активному транспорту плазматическая мембрана отделяет цитоплазму клетки, где содержание Ca^{2+} низко (~100 нМ), от внеклеточного пространства, концентрация Ca^{2+} в котором на четыре порядка выше (1–2 мМ). В основном Ca^{2+} внутри клетки депонирован и содержится во внутриклеточных компартментах, таких как эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, эндосомы, лизосо-

мы и митохондрии, где его концентрация составляет 10–100 мкМ. Перечисленные органеллы принимают участие в поддержании общего Ca^{2+} -гомеостаза клетки, а также играют роль хранилища и источника Ca^{2+} в генерации локальных и глобальных Ca^{2+} -сигналов в ответ на внешние стимулы [1–3].

Разработка подходов для мониторинга свободного Ca^{2+} в живой клетке стала методологическим вызовом для исследований в области клеточной биологии, среди предлагавшихся приемов наиболее эффективным оказалось введение в клетку Ca^{2+} -чувствительного агента, оптические свойства которого меняются при изменении кон-

центрации внутриклеточного Ca^{2+} . Первая относительно удачная попытка визуализации изменения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} была предпринята еще в 1928 году путем инъекции красителя ализарина сульфоната в амебу [4]. Однако рутинным мониторинг внутриклеточного Ca^{2+} стал лишь спустя десятилетия, когда в исследовательскую практику были внедрены синтетические Ca^{2+} -зонды, флуоресценция которых зависит от концентрации Ca^{2+} в диапазоне 50 нМ—1 мкМ. Особенно полезными оказались Ca^{2+} -зонды, флуорофор которых связан с производным ацетоксиметилового эфира, который позволяет им проникать через плазмалемму и благодаря гидролизу внутриклеточными эстеразами аккумулироваться внутри клетки [5–8]. Такие Ca^{2+} -зонды позволили установить многие ключевые механизмы внутриклеточной Ca^{2+} -сигнализации и остаются инструментом, широко используемым в клеточной биологии. По мере развития представлений о внутриклеточной сигнализации стало ясно, что информации, получаемой путем мониторинга цитозольного Ca^{2+} , недостаточно для анализа функционирования разветвленных внутриклеточных сигнальных систем, даже если ограничиваться только Ca^{2+} -зависимыми процессами. Так, одним из основных путей стимул-зависимого увеличения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клетки является высвобождение Ca^{2+} из ретикулума, которое требуется для регуляции различных клеточных процессов, таких как сокращение, оплодотворение, секреция везикул, синаптическая пластичность [9]. Гомеостаз Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме имеет решающее значение для реализации определенных клеточных функций, и его нарушение ассоциируется с развитием ряда клеточных и тканевых патологий, включая нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания, а истощение ретикулярного Ca^{2+} вызывает апоптоз [10]. Таким образом, исследование гомеостаза Ca^{2+} внутри эндоплазматического ретикулума необходимо для более глубокого понимания механизмов генерации внутриклеточных Ca^{2+} -сигналов и их роли в физиологии и патофизиологии клетки.

Поскольку в покое нормальный уровень Ca^{2+} в ретикулуме оценивается величиной порядка 100 мкМ [1], для мониторинга опустошения Ca^{2+} -депо требуется использовать Ca^{2+} -зонды с низкой аффинностью к Ca^{2+} , такие как Mag-Fura-2 ($K_d = 25$ мкМ), Fluo-5N ($K_d = 90$ мкМ), Oregon Green 488 BAPTA-5N ($K_d = 20$ мкМ) и ряд других. Хотя эти низкоаффинные Ca^{2+} -зонды принципиально позволяют осуществлять мониторинг изменения депонированного Ca^{2+} , не существует методов их загрузки исключительно в люминальное про-

странство ретикулума без загрузки в другие внутриклеточные компартменты и прежде всего в цитоплазму клетки. Поэтому в тотальную Ca^{2+} -зависимую флуоресценцию клетки, содержащей Ca^{2+} -зонд, вносят вклад молекулы флуорофора, локализованные как в ретикулуме, так и в цитозоле. Поскольку объем цитозоля превышает объем ретикулума как минимум на два порядка, то в процессе генерации цитоплазматических Ca^{2+} -сигналов количество низкоаффинных флуорофоров, связанных с Ca^{2+} в цитоплазме и ретикулуме, обычно сопоставимо. В связи с этим флуоресцентный сигнал, соответствующий повышению Ca^{2+} в цитоплазме (0.1 → 1 мкМ), обычно превышает или нивелирует флуоресцентный сигнал, соответствующий падению Ca^{2+} в ретикулуме (100 → 10 мкМ). По этой причине мониторинг Ca^{2+} в ретикулуме с помощью низкоаффинных Ca^{2+} -зондов не может быть выполнен без удаления зонда из цитоплазмы с помощью диализа или пермеабилзации клетки [11], что, в свою очередь, сопровождается потерей важных внутриклеточных регуляторных компонентов. Таким образом, накопленный опыт работы с синтетическими Ca^{2+} -зондами и знания о внутриклеточных процессах выявили ряд ограничений этого поколения Ca^{2+} -индикаторов и инициировали создание индикаторов нового поколения, а именно генетически кодируемых Ca^{2+} -сенсоров на основе флуоресцентных белков [12–14].

В связи с простотой оптического мониторинга наиболее перспективными генетически кодируемыми Ca^{2+} -индикаторами являются Ca^{2+} -чувствительные флуоресцентные белки, представляющие собой химеры флуоресцентного (GFP) и Ca^{2+} -чувствительного (кальмодулин) белков. Такие индикаторы обладают яркостью, достаточной для визуализации динамики Ca^{2+} с субклеточным разрешением, а их реакция на изменение концентрации Ca^{2+} обратима и не требует кофакторов. Главным же их преимуществом над синтетическими Ca^{2+} -зондами является возможность их специфической экспрессии в определенных органеллах, которая достигается благодаря внесению в молекулу индикатора специфичной сигнальной последовательности, направляющей синтезированный белок в целевые органеллы. Таким образом, флуоресцентные генетически кодируемые Ca^{2+} -индикаторы являются эффективным инструментом для мониторинга Ca^{2+} избирательно в различных клеточных компартментах [15–17].

Генетически кодируемые Ca^{2+} -индикаторы семейства GECO являются на сегодняшний день самыми совершенными представителями инди-

каторов своего класса. GECO, разработанные как сенсор цитоплазматического Ca^{2+} , характеризуются высокими аффинностью к Ca^{2+} ($K_d = 300\text{--}1100$ нМ) и яркостью флуоресценции, обеспечивающей хорошее соотношение сигнал/шум регистрируемых от них сигналов. Также немаловажным для практического применения является широкая цветовая палитра представителей этого семейства: на сегодняшний день в ней присутствуют белки, флуоресцирующие в зеленой (G-GECO), синей (B-GECO) и красной (R-GECO1) областях спектра, а также сине-зеленые ратиометрические индикаторы (GEM-GECO1 и GEX-GECO1) [15]. На основе GECO было создано семейство генетически кодируемых Ca^{2+} -индикаторов SERIA, представители которого характеризуются высокой интенсивностью флуоресценции, хорошим соотношением сигнал/шум и широкой цветовой палитрой, присущими GECO, но отличаются от них пониженным сродством к Ca^{2+} ($K_d = 500\text{--}700$ мкМ). Благодаря внесению в аминокислотную последовательность этих сенсоров соответствующего сигнального пептида они транспортируются в эндоплазматический ретикулум, что позволяет детектировать динамические изменения концентрации исключительно ретикулярного Ca^{2+} [16, 17].

Таким образом, генетически кодируемые Ca^{2+} -индикаторы являются эффективным инструментом для более детального анализа механизмов внутриклеточной Ca^{2+} -сигнализации и Ca^{2+} -зависимых процессов, позволяя, в частности, проводить независимый мониторинг ретикулярного и цитоплазматического Ca^{2+} . Данная работа была направлена на создание моноклональных клеточных линий, экспрессирующих флуоресцентные сенсоры цитоплазматического GEM-GECO1 и ретикулярного Ca^{2+} R-SERIA1er, с целью расширения методологических возможностей изучения механизмов внутриклеточной трансдукции внешних стимулов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток. Клетки линии НЕК 293 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных) культивировали в среде DMEM (Gibco) с высоким содержанием глюкозы с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma), 2 мМ глутамин (Sigma) (ростовая среда) во влажной атмосфере с 5% содержанием CO_2 в воздухе при 37°C. Полученные моноклональные линии культивировали в присутствии 300 мкг/мл антибиотика G418 (Invivogen).

Трансфекция клеток. Клетки НЕК 293 трансфицировали плазмидными векторами CMV-GEM-

GECO1 (#32442, Addgene) и CMV R-SERIA1er (#58216, Addgene) одновременно с использованием набора для липофекции Lipofectamine 3000 (Invitrogen) по оптимизированному согласно рекомендациям производителя протоколу. Накануне трансфекции клетки НЕК 293 рассеивали в ростовой среде из расчета $(2\text{--}4) \times 10^5$ клеток в 1 лунку 12-лучночного планшета. К 800 мкл ростовой среды в лунку добавляли трансфекционную смесь, которая содержала 200 мкл среды OptiMEM (Gibco), 2 мкл P3000 Reagent (Invitrogen), 2 мкл Lipofectamine 3000 (Invitrogen), и по 1 мкг каждого плазмидного вектора. Через 24 ч среду заменяли на свежую ростовую и оценивали эффективность трансфекции по наличию в клетках флуоресценции экспрессируемых белков. Через 48 ч клетки обрабатывали раствором Версена (Sigma) и 0.25% раствором трипсина (Sigma), затем рассеивали в соотношении 1 : 10 в чашку Петри 60 мм и культивировали в присутствии 700 мкг/мл селективного антибиотика G418 (Invivogen) в течение 2 недель. В результате селекции на чашке оставались колонии клеток, обладающие различным уровнем флуоресценции белков интереса, обусловленным различиями в уровне их экспрессии.

Сортировка клеток. Полученную гетерогенную популяцию клеток использовали для получения клеточных моноклонов с высоким уровнем экспрессии обоих экспрессируемых белков. Накануне сортировки $(3\text{--}4) \times 10^6$ клеток переносили в 25 см² культуральный флакон в 5 мл ростовой среды. Непосредственно перед сортировкой клетки однократно обрабатывали раствором Версена и затем инкубировали в 0.5 мл 0.25% раствора трипсина до полного открепления клеток от пластика, ферментативную реакцию останавливали добавлением 1 мл ростовой среды и переносили клетки в коническую микропробирку объемом 1.5 мл. Затем клетки осаждали центрифугированием при 50 g и ресуспендировали в 1 мл среды для сортировки клеток на основе фосфатного буфера (pH 7.4) и 1% эмбриональной бычьей сыворотки. Для получения суспензии одиночных клеток их пропускали через клеточное сито с размером ячейки 40 мкм (Corning cell strainer, Sigma). Полученную суспензию клеток анализировали с помощью сортера клеток FACS Aria SORP (BD Biosciences). Флуоресценцию клеток возбуждали при длинах волн 407 и 561 нм, эмиссию регистрировали в областях 525 ± 10 нм и 582 ± 7.5 нм для GEM-GECO1 и R-SERIA1er соответственно. Для получения моноклонов отбирали клетки, обладающие наибольшей интенсивностью флуоресценции обоих экспрессируемых белков, и помещали их по одной в каждую лунку 96-луночного план-

шета, содержащую 150 мкл ростовой среды с повышенным до 15% содержанием сыворотки.

Наращивание моноклональных клеточных линий. Отсортированные и помещенные по одной в лунку клетки наращивали до количества, достаточного для проведения их тестирования. Планшеты с клетками помещали в CO_2 -инкубатор, на 7 день культивирования в лунки добавляли по 50 мкл ростовой среды, содержащей 10% сыворотки. На 10 день проводили первичный визуальный контроль наличия в лунках живых моноклонов и их флуоресценции с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss). Растущие клеточные моноклоны обладали разной пролиферативной активностью, в связи с этим лунки 96-луночных планшетов раз в 3 дня проверяли на наличие клонов, достигших 50–70% конфлюентности; такие клоны переносили в лунки с большей ростовой поверхностью (24-луночный планшет). Для дальнейшего наращивания отбирали клоны, флуоресценция которых была наиболее яркой и однородной. При пересеве моноклонов с лунки 12- на лунку 6-луночного планшета часть клеток каждого клона оценивали визуально и тестировали физиологически.

Конфокальная микроскопия. Клетки каждого полученного моноклона анализировали визуально с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica), оборудованного объективом с масляной иммерсией Plan Achromat HCX PL APO Lambda Blue 63× 1.4 Oil UV (Leica). Изображения регистрировали с помощью программы Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) ver. 2.6.4.8702 (Leica). Флуоресценцию возбуждали при 458 и 543 нм, эмиссию регистрировали в областях 490–550 и 560–660 нм для GEM-GECO1 и R-CEPIA1ег соответственно.

Микрофотометрия. Для создания запланированного клеточного сенсора недостаточно только визуального контроля флуоресценции белковых Ca^{2+} -индикаторов в полученных клетках. Заключительный этап отбора клонов заключался в их тестировании по физиологическим критериям, а именно по характеристикам Ca^{2+} -сигналов, генерируемых клетками в ответ на стимуляцию ацетилхолином. Клетки прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak и выдерживали при комнатной температуре 30 мин. Внеклеточный раствор содержал (мМ): NaCl – 110, KCl – 5.5, CaCl_2 – 2, MgCl_2 – 0.8, HEPES – 10, глюкозу – 10. Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20×/0.75 и цифровой ECCD камерой LucaR (Andor Technology). Флуо-

ресценцию клеток поочередно возбуждали при 380 ± 5.5 и 572 ± 17.5 нм, эмиссию регистрировали в областях 523 ± 23 и 634 ± 34 нм для GEM-GECO1 и R-CEPIA1ег соответственно. Изменение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме и эндоплазматическом ретикулуме клетки оценивали по относительному изменению интенсивностей флуоресценции $\Delta F/F_0$ GEM-GECO1 и R-CEPIA1ег соответственно, где $\Delta F = F_0 - F$, F и F_0 – текущая интенсивность эмиссии Ca^{2+} -индикатора и его эмиссия в начале регистрации соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS Elements (Nikon).

Криоконсервация. Отобранные по физиологическим критериям моноклональные линии клеток культивировали для получения клеточной массы, достаточной для криоконсервации 10 криоампул, по $(4 - 5) \times 10^6$ клеток в каждой. Криоконсервацию осуществляли в растворе сыворотки с 10% DMSO.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящая работа была направлена на создание клеточной тест-системы с генетически кодируемыми сенсорами цитоплазматического и ретикулярного Ca^{2+} . Представляется, что такая клеточная система расширит возможности анализа сопряжения поверхностных рецепторов с внутриклеточной Ca^{2+} -сигнальной системой и, в частности, будет полезна для изучения механизмов регуляции выброса депонированного Ca^{2+} . Основой для создания сенсора стали клетки НЕК 293; такой выбор был обусловлен тем, что клетки этой линии эндогенно экспрессируют множество G-белков, которые необходимы для сопряжения GPCR-рецепторов с различными внутриклеточными сигнальными системами, в том числе с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} . В качестве молекулярного сенсора цитоплазматического Ca^{2+} был выбран Ca^{2+} -чувствительный флуоресцентный белок GEM-GECO1. Высокая аффинность GEM-GECO1 к Ca^{2+} ($K_d = 340$ нМ) и его оптические свойства, а именно эмиссия на двух длинах волн 511 и 455 нм при возбуждении в районе 390 нм, позволяют проводить ратиометрические измерения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клетки [15]. Для мониторинга Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме использовали Ca^{2+} -чувствительный флуоресцентный ($\lambda_{\text{ex}} = 562$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 584$ нм) белок R-CEPIA1ег, который обладает пониженной аффинностью к Ca^{2+} ($K_d = 565$ мкМ) и содержит сигнальную последовательность, позволяющую ему находиться исключительно в эндоплазматическом ретикулуме [16]. Спектры воз-

буждения и эмиссии этих белков не пересекаются, что дает возможность проводить одновременную регистрацию их флуоресценции, позволяя тем самым независимо регистрировать изменения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме и ретикулуме клетки. Следует отметить, что эффективность временной трансфекции клеток линии НЕК 293 плазмидными векторами обычно не превышает 50%, при этом получающиеся клеточные популяции гетерогенны и содержат субпопуляции клеток с весьма переменным уровнем экспрессии белков интереса. Между тем, анализ внутриклеточных Ca^{2+} -сигналов требует стабильного и высокого уровня экспрессии обоих Ca^{2+} -индикаторов в доминирующей клеточной популяции. В связи с этим возникла необходимость создания моноклональных клеточных линий с требуемыми свойствами.

Для получения клеточных линий, стабильно экспрессирующих белки интереса, необходимо, чтобы кодирующие их последовательности встроились в геном клеток. Плазмидный вектор pCMV R-CEPIA1eg несет в себе ген устойчивости к антибиотику G-418, что позволяет производить отбор клеток на селективной среде и значительно обогащать популяцию клетками, у которых кодирующая белок последовательность встроилась в геном. Однако вектор CMV-GEM-GECO1 не несет гена устойчивости к какому-либо антибиотику. Мы предположили, что, хотя оба плазмидных вектора попадают в одну и ту же клетку примерно равновероятно, при культивировании в присутствии G-418 происходит сегрегация клеток — нуклеотидная последовательность R-CEPIA1eg закрепляется в геноме, в то время как встраивание в геном последовательности GEM-GECO1, не подверженной селекционному давлению, носит случайный характер. В эксперименте оказалось, что спустя 24 ч после трансфекции практически все клетки, экспрессирующие R-CEPIA1eg, также экспрессировали GEM-GECO1, судя по специфической флуоресценции клеток в зеленой и красной областях спектра. После 2 недель культивирования в присутствии 700 мкг/мл G418 в ростовой среде ~60% клеток содержали R-CEPIA1eg, хотя экспрессия GEM-GECO1 сохранилась только у 5% из них. Поскольку за это время клетки претерпели многократные деления, можно было полагать, что у клеток, сохранивших экспрессию обоих белков в процессе селекции, кодирующие их последовательности были встроены в геном. Поэтому полученная клеточная популяция подвергалась дальнейшей селекции с использованием клеточного сортера. В результате было приготовлено три 96-луночных планшета, и в каждой из 288 лунок должно было содержаться не более одной клетки, обладающей высоким уровнем флуоресценции

обоих Ca^{2+} -сенсоров. На десятый день культивирования выживаемость клонов составила ~20%. В четырех выживших клонах флуоресценция GEM-GECO1 не детектировалась, а в пяти других уровень флуоресценции того или другого Ca^{2+} -индикатора заметно варьировал. Кроме того, моноклоны обладали различной способностью к пролиферации, и некоторые из них прекращали пролиферировать после нескольких делений. По пролиферативной активности, яркости и локализации флуоресценции обоих Ca^{2+} -индикаторов для дальнейшего анализа были отобраны 32 клона.

Отобранные визуально GEM-GECO1/R-CEPIA1eg клоны исследовали с использованием функциональных тестов на основе микрофотографии (Ca^{2+} imaging). Для оценки чувствительности и динамического диапазона генетически кодируемых Ca^{2+} -сенсоров клетки полученных моноклональных линий стимулировали ацетилхолином, который в немодифицированных НЕК 293 вызывал мобилизацию Ca^{2+} в 70–80% клеток. Хотя цитоплазматический индикатор GEM-GECO1 позволяет проводить ратиометрические измерения концентрации Ca^{2+} благодаря эмиссии на двух длинах волн (455 и 511 нм), мы ограничились технически более простым вариантом и регистрировали эмиссию GEM-GECO1 только в области 523 ± 23 нм. Практически все GEM-GECO1/R-CEPIA1eg клоны в ответ на ацетилхолин демонстрировали хорошо детектируемые Ca^{2+} -сигналы от цитоплазматического индикатора, однако в большинстве из них сигналы, регистрируемые от ретикулярного сенсора, обладали неудовлетворительным соотношением сигнал/шум. Хотя сам факт падения уровня ретикулярного Ca^{2+} зарегистрировать удавалось, мониторинг деталей и динамики этого процесса оказывался невозможным.

По результатам проведенных физиологических экспериментов из 32 клонов были отобраны 5, для которых был характерен высокий уровень экспрессии обоих Ca^{2+} -индикаторов практически во всех клетках. Характерно, что R-CEPIA1eg был локализован в примембранной области (рис. 1а), что соответствует расположению эндоплазматического ретикулума, GEM-GECO1 же был распределен в клетке более равномерно (рис. 1б), что свидетельствует о его цитоплазматической локализации. Зарегистрированные с помощью генетически кодируемых Ca^{2+} -индикаторов сигналы вполне соответствовали нашим представлениям о механизмах генерации Ca^{2+} -ответов на ацетилхолин, которые возникают в цитоплазме клеток НЕК 293 за счет выброса депонированного Ca^{2+} . При стимуляции клеток интенсивность флуоресценции GEM-GECO1 в области 520 нм падала

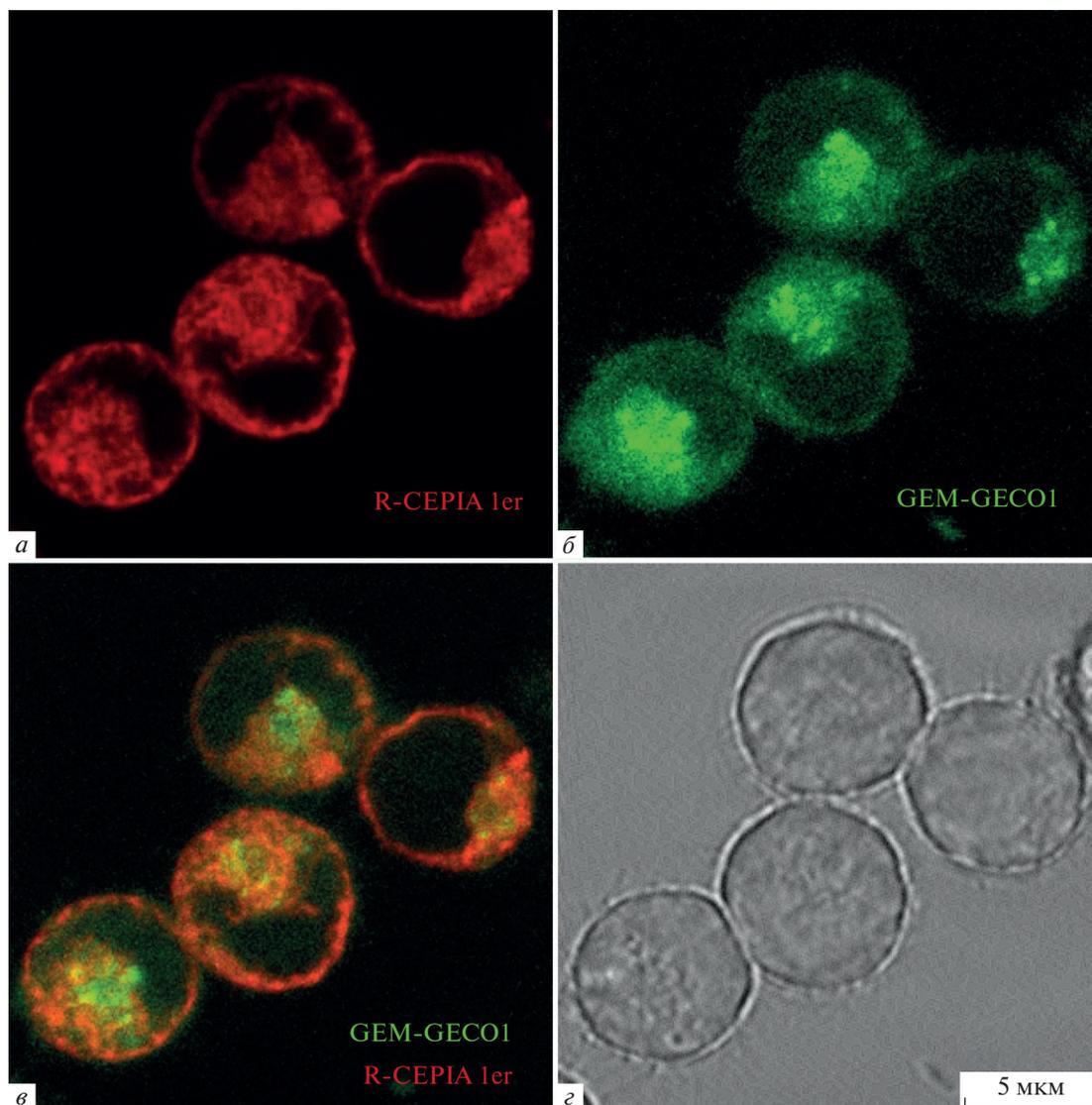


Рис. 1. Конфокальные изображения клеток линии GEM-GECO1/R-CEPIA1er. *a* – Специфическая (красная) флуоресценция клеток, индуцированная экспрессией R-CEPIA1er, *б* – специфическая (зеленая) флуоресценция клеток, индуцированная экспрессией GEM-GECO1, *в* – суперпозиция флуоресцентных изображений *a* и *б*; *г* – те же клетки в проходящем свете. Все изображения представлены в одном масштабе, указанном на *г*

(рис. 2, зеленая кривая), отражая повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клеток [15], интенсивность флуоресценции CEPIA1er также падала (рис. 2, красная кривая), отражая выброс ретикулярного Ca^{2+} [16]. Основным достоинством отобранных клонов было то, что сигналы, регистрируемые от сенсора ретикулярного Ca^{2+} R-CEPIA1er, обладали высоким соотношением сигнал/шум при достаточном динамическом диапазоне, что позволяло отслеживать динамику выброса Ca^{2+} из ретикулума достаточно детально. Так, Ca^{2+} -ответы ряда клеток на ацетилхолин носили осцилляционный характер, и это находило отражение не только в сигнале, регистрируемом от

GEM-GECO1, но и в сигнале R-CEPIA1er, что наглядно демонстрирует способность сенсоров быстро реагировать на изменение концентрации Ca^{2+} в обоих компартментах клетки (рис. 2).

Таким образом, полученные моноклональные клеточные линии, экспрессирующие генетически кодируемые Ca^{2+} -индикаторы с определенной внутриклеточной локализацией, позволяют эффективно проводить одновременный мониторинг Ca^{2+} в цитоплазме и ретикулуме одиночных клеток. В дальнейшем эти клеточные системы могут быть использованы для анализа функционирования эндоплазматического ретикулума как Ca^{2+} -депо, в частности для изучения механизмов

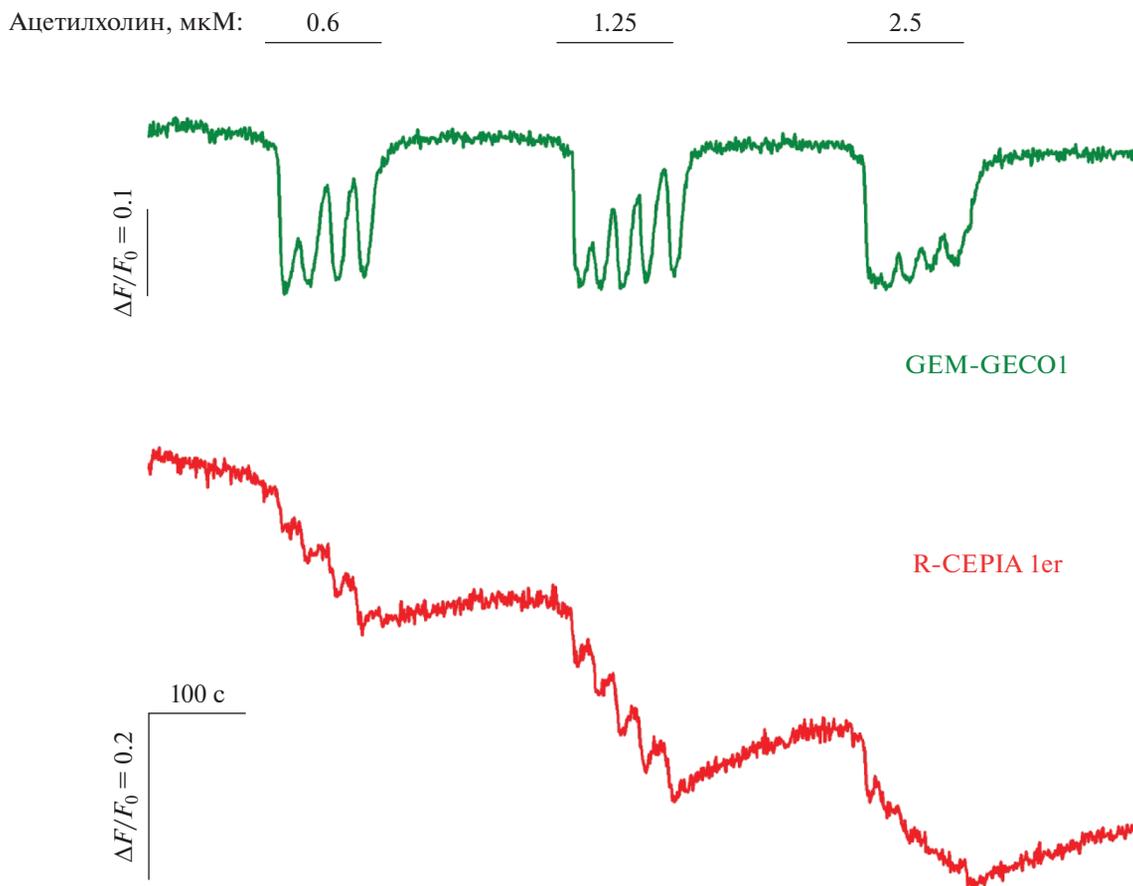


Рис. 2. Мониторинг Ca^{2+} в клетках линии GEM-GECO1/R-CEPIA1er. Синхронная регистрация флуоресценции GEM-GECO1 (зеленая кривая), отражающей динамику цитозольного Ca^{2+} при аппликации ацетилхолина в различных дозах, и флуоресценции R-CEPIA1er (красная кривая), отражающей динамику ретикулярного Ca^{2+} . Падение флуоресценции GEM-GECO1 соответствует повышению концентрации цитозольного Ca^{2+} , падение флуоресценции R-CEPIA1er соответствует понижению концентрации Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме. Данные представлены как $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F – текущая интенсивность флуоресценции, F_0 – средняя интенсивность флуоресценции в начальный момент регистрации.

Ca^{2+} -индуцированного выброса Ca^{2+} . Кроме того, полученные клоны могут быть использованы как тест-система для установления сопряжения поверхностных рецепторов с внутриклеточной Ca^{2+} -сигнализацией.

Авторы благодарят Д.М. Поташникову за помощь в проведении работ по сортировке клеток (поддержаны Программой развития МГУ) и А.В. Кучина за помощь в работе с конфокальным микроскопом (сектор оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН).

Работа поддержана грантом РФФ № 19-75-10068.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Berridge M.J. 2016. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol. Rev.* **96**, 1261–1296.
- Patel S., Ramakrishnan L., Rahman T., Hamdoun A., Marchant J.S., Taylor C.W., Brailoiu E. 2011. The endo-lysosomal system as an NAADP-sensitive acidic Ca^{2+} store: Role for the two-pore channels. *Cell Calcium.* **50** (2), 157–167.
- López-Crisosto C., Bravo-Sagua R., Rodriguez-Peña M., Mera C., Castro P.F., Quest A.F.G., Rothermel B.A., Cifuentes M., Lavandero S. 2015. ER-to-mitochondria miscommunication and metabolic diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1852**, 2096–2105.
- Pollack H. 1928. Micrurgical studies in cell physiology: VI calcium ions in living protoplasm. *J. Gen. Physiol.* **11**, 539–545.
- Tsien R.Y. 1980. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Design, synthesis and properties of prototype structures. *Biochemistry.* **19**, 2396–2404.
- Tsien R.Y. 1981. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature.* **290**, 527–528.
- Tsien R.Y., Pozzan T., Rink T.J. 1982. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calci-

- um monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell Biol.* **94**, 325–334.
8. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440–3450.
 9. Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 11–21.
 10. Mekahli D., Bultynck G., Missiaen L. 2011. Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3** (6), a004317.
 11. Khan S.A., Rossi A.M., Riley A.M., Potter B.V., Taylor C.W. 2013. Subtype-selective regulation of IP(3) receptors by thimerosal via cysteine residues within the IP(3)-binding core and suppressor domain. *Biochem. J.* **451** (2), 177–184.
 12. Raimondo J.V., Joyce B., Kay L., Schlagheck T., Newey S.E., Srinivas S., Akerman C.J. 2013. A genetically-encoded chloride and pH sensor for dissociating ion dynamics in the nervous system. *Front. Cell Neurosci.* **7**, 202.
 13. Lindenburg L., Merckx M. 2014. Engineering genetically encoded FRET sensors. *Sensors (Basel)*. **14** (7), 11691–11713.
 14. Kwon S.K., Hirabayashi Y., Polleux F. 2016. Organelle-specific sensors for monitoring Ca^{2+} dynamics in neurons. *Front. Synaptic Neurosci.* **8**, 29.
 15. Zhao Y., Araki S., Wu J., Teramoto T., Chang Y.F., Nakano M., Abdelfattah A.S., Fujiwara M., Ishihara T., Nagai T., Campbell R.E. 2011. An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators. *Science*. **333** (6051), 1888–1891.
 16. Suzuki J., Kanemaru K., Ishii K., Ohkura M., Okubo Y., Iino M. 2014. Imaging intraorganellar Ca^{2+} at subcellular resolution using CEPIA. *Nat. Commun.* **5**, 4153.
 17. Suzuki J., Kanemaru K., Iino M. 2016. Genetically encoded fluorescent indicators for organellar calcium imaging. *Biophys. J.* **111** (6), 1119–1131.

Cellular Test System with Genetically Encoded Indicators of Cytosolic and Reticular Ca^{2+}

P. D. Kotova^{1, *} and O. A. Rogachevskaja¹

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

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

Calcium ions are a universal second messenger that regulates numerous intracellular processes. Many agonists and first messengers involved in cell-to-cell communications and autocrine/paracrine regulation act through surface receptors coupled to the mobilization of intracellular Ca^{2+} . The current concept of intracellular Ca^{2+} signaling is mainly based on monitoring of Ca^{2+} in the cytosol. However, the Ca^{2+} exchange between the cytosol and a variety of intracellular organelles plays an important role in cell and tissue physiology. Therefore, monitoring of Ca^{2+} signals in cell compartments is obligatory for uncovering key aspects of intracellular Ca^{2+} signaling. Until recently, intracellular Ca^{2+} signaling was studied using synthetic Ca^{2+} probes, which cannot be selectively loaded into cell compartments involved in Ca^{2+} homeostasis, including the cytosol, endoplasmic reticulum, mitochondria, and lysosomes. Therefore, one tried to identify Ca^{2+} signals specific for compartments by using Ca^{2+} probes with different affinities in combination with the permeabilization of the plasma membrane. In the last decade, an array of Ca^{2+} sensitive fluorescent proteins have been engineered and used as genetically encoded Ca^{2+} indicators. One of the main advantages of these indicators is that they can be selectively expressed and retained in certain organelles. In this article we describe the elaboration of monoclonal cell lines, which functionally express both fluorescent sensors of cytosol Ca^{2+} GEM-GECO1 and reticular Ca^{2+} R-CEPIA1er. The obtained cell clones can be used as a test system for the analysis of the coupling of surface receptors to the intracellular Ca^{2+} signaling and for studying mechanisms controlling Ca^{2+} release.

Keywords: genetically encoded Ca^{2+} indicators, intracellular Ca^{2+} signaling, cell culture

УДК 57.085.23;577.112.6;578.23;547.92

МОДУЛЯЦИЯ ХОЛЕСТЕРИН-ЗАВИСИМОЙ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ IC-21 CRAC-СОДЕРЖАЩИМИ ПЕПТИДАМИ С ЗАМЕНАМИ МОТИВООБРАЗУЮЩИХ АМИНОКИСЛОТ

© 2020 г. А. Я. Дунина-Барковская^{а, *}, Х. С. Вишнякова^б

^аНИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

^бИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

*e-mail: dunina@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 17.05.2020 г.

После доработки 28.05.2020 г.

Принята к публикации 29.05.2020 г.

Регуляция активности многих мембранных белков, таких как рецепторы, ионные каналы, транспортеры и ферменты, является холестерин-зависимой, однако механизмы этой регуляции остаются неясными. Ряд исследований указывает на то, что мембранные белки могут прямо взаимодействовать с холестерином благодаря наличию в их структуре так называемых CRAC-мотивов (Cholesterol-Recognizing Aminoacid Consensus). Один из возможных путей проверить и развить эту концепцию — создание CRAC-содержащих пептидов и исследование их влияния на клеточные функции. Ранее мы показали, что сконструированный нами пептид RTKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLR (далее P4), содержащий два CRAC-мотива, модулирует холестерин-зависимые взаимодействия культивируемых макрофагов IC-21 с 2-мкм частицами. В настоящей работе мы использовали ту же экспериментальную систему для выяснения роли CRAC-мотивов и отдельных мотивообразующих аминокислот; с этой целью была протестирована активность пептидов, подобных родительскому пептиду P4, но с различными модификациями CRAC-мотивов. Мы обнаружили, что пептид STKLSEMLSELGNMDKASKLSRKLSR (далее Mut2), полученный при замене серином всех мотивообразующих аминокислот в обоих CRAC-мотивах пептида P4 (W → S, V → S, R/K → S), не оказывал достоверных изменений активности клеток в диапазоне концентраций 0.5–50 мкМ, при которых наблюдались эффекты P4. Также оказался неэффективным пептид RTKLSEMLVELGNMDKAVKLSRKLR (Mut3), в обоих CRAC-мотивах которого были заменены серином только ароматические аминокислоты (W → S). Пептид STKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLSR (Mut4) с заменами только катионных аминокислот в CRAC-мотивах (R/K → S) оказывал практически такое же действие на активность клеток IC-21, что и родительский пептид P4, с хорошо выраженной колоколообразной кривой доза–эффект. При низких концентрациях (1–4 мкМ) Mut4 значительно увеличивал число частиц на клетку, при более высоких концентрациях этот параметр снижался, а при 50 мкМ Mut4 вызывал сильный токсический эффект. Наконец, пептид EWGMAVLWERNRKLKDLKVLKMLRT (Mut1), состоящий из тех же аминокислотных остатков, что и P4, но в случайном порядке (“scramble”), и содержащий один случайно образованный короткий CRAC-мотив, отличный от CRAC-мотивов родительского пептида P4, вызывал умеренную, но достоверную стимуляцию при 4–10 мкМ и не оказывал токсического действия при 50 мкМ. Как и в случае пептида P4, эффекты Mut4 и Mut1 зависели от содержания холестерина в клеточных мембранах. После инкубации клеток с метил-β-циклодекстрином, экстрагирующим холестерин из мембран, стимулирующие эффекты Mut4 и Mut1 при низких концентрациях пептидов подавлялись. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в рамках использованной экспериментальной системы CRAC-мотивы играют важную роль в механизме индуцированных пептидами модуляций холестерин-зависимых клеточных функций и что для эффекта пептида критично присутствие мотивообразующих ароматических аминокислот; замена катионных аминокислот не снижает активность пептида. Мы считаем, что CRAC-пептиды могут служить основой для развития новых инструментов для направленной регуляции активности холестерин-зависимых мембранных белков и, в частности, для разработки новых антимикробных и иммуномодулирующих средств.

Ключевые слова: холестерин, холестерин-распознающий аминокислотный консенсус (CRAC), CRAC-мотив, пептиды, белок M1 вируса гриппа, метил-β-циклодекстрин, макрофаги, адгезия

DOI: 10.31857/S0233475520050059

ВВЕДЕНИЕ

Активность многих мембранных белков — рецепторов, ионных каналов, транспортеров, ферментов и т. д. — является холестерин-зависимой [1–7]. Нарушения в распределении, транспорте и метаболизме холестерина являются существенным фактором патогенеза таких заболеваний, как атеросклероз [2, 8], СПИД [9], а также болезнью Альцгеймера [10], Ниманна–Пика (Niemann–Pick) [11], Шарко–Мари–Тута (Charcotte–Marie–Tooth) [12] и многих других. Более того, холестерин-зависимые процессы играют ключевую роль в развитии многих инфекционных болезней, поскольку взаимодействие патогена с клеткой хозяина во многих случаях происходит при участии холестерина. Например, проникновение некоторых вирусов [9, 13–15] и бактерий [16–20] в клетку зависит от присутствия холестерина и липидных рафтов [15, 16, 21] в мембранах клеток хозяина. Понимание молекулярных механизмов взаимодействий белок–холестерин и их роли в клеточных процессах может создать основу для развития новых методов профилактики и лечения таких болезней.

В 1998 г. в работе Li и Papadopoulos [22] было показано, что митохондриальный холестерин-транспортирующий белок BPR (бензодиазепиновый рецептор периферического типа, позже переименованный в белок-транслокатор, TSP0 [23]), содержит участок ATVNLNYYVWRDNS, критически необходимый для связывания и транспорта холестерина. Авторы также обнаружили, что подобные участки, содержащие в определенном порядке катионные (R/K), ароматические (Y) и неполярные (V/L/I) аминокислотные остатки, есть и в других клеточных белках, взаимодействующих с холестерином. Авторы назвали этот участок холестерин-распознающей аминокислотной консенсусной последовательностью (cholesterol-recognizing amino-acid consensus, CRAC) и предложили общую формулу L/V-(X)₍₁₋₅₎-Y-(X)₍₁₋₅₎-R/K [22]. Подробный анализ этой идеи и ее последующей эволюции в ходе экспериментальных и теоретических исследований проведен в обзорах [24, 25].

Одним из путей проверки и развития идеи о холестерин-распознающих последовательностях в клеточных белках является дизайн CRAC-содержащих пептидов и изучение их влияния на холестерин-зависимые клеточные функции. Если эта концепция верна, то CRAC-содержащие пептиды могут оказаться полезным инструментом не только для исследований, но также для регуляции холестерин-зависимых процессов в клетках. Возможность такой регуляции *in vitro* была прямо продемонстрирована авторами CRAC-концепции в 2001 г. [26].

Ранее мы показали, что новый пептид RTKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLR (далее P4),

сконструированный нами из двух CRAC-содержащих пептидов, соответствующих α -спиралям 3 и 6 белка M1 вируса гриппа, дозозависимо модулирует взаимодействия культивируемых макрофагов IC-21 с 2-мкм частицами [27, 28]. В настоящей работе, чтобы определить роль CRAC-мотивов и мотивообразующих аминокислот в наблюдаемых эффектах P4, мы сконструировали мутантные пептиды, по аминокислотному составу соответствующие P4, но с модифицированными CRAC-мотивами, и исследовали эффекты новых пептидов в той же экспериментальной системе. Мы обнаружили, что: (1) пептид Mut2 с заменами всех мотивообразующих аминокислот серином (V→S; W→S; R/K→S) не оказывал существенного влияния на взаимодействия макрофагов IC-21 с частицами; (2) также не влиял на активность клеток пептид Mut3, у которого были произведены замены только ароматических аминокислот в обоих CRAC-мотивах (W→S); (3) эффекты пептида Mut4 с заменами только катионных аминокислот в обоих CRAC-мотивах (R/K→S) практически не отличались от эффектов родительского пептида P4: при низких концентрациях (1–4 мкМ) Mut4 стимулировал клеточную активность, а при высоких концентрациях (~50 мкМ) оказывал токсическое действие; (4) пептид Mut1, составленный из тех же аминокислот, что и P4, но в случайном порядке (“scramble”), и имеющий один случайно образованный CRAC-мотив, отличающийся от CRAC-мотивов пептида P4, оказывал на клетки умеренное стимулирующее действие при 4–10 мкМ, но не был токсичен при 50 мкМ; (5) предварительная обработка клеток метил- β -циклодекстрином, экстрагирующим мембранный холестерин, приводила к ослаблению стимулирующих эффектов пептидов Mut4 и Mut1. Полученные данные свидетельствуют о том, что в механизме вызываемой пептидом P4 модуляции холестерин-зависимой активности клеток CRAC-мотивы играют существенную роль, и в мотиве критично присутствие ароматических аминокислот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пептиды. В работе были использованы следующие пептиды (табл. 1): Ac-**RTKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLR**-NH₂ (пептид P4, 26 аминокислотных остатков, мол. масса (MM) 3764 Да; здесь и далее CRAC-мотив выделен подчеркиванием; мотивообразующие аминокислоты или их замены выделены жирным шрифтом), Ac-**STKLSEMLSELGNMDKASKLSRKLRSR**-NH₂ (Mut2, MM 3434 Да; 5,21W→S; 9,18V→S; 1R,25K→S), Ac-**RTKLSEMLVELGNMDKAVKLSRKLKR**-NH₂ (Mut3, MM 3525 Да; 5,21W→S), Ac-**STKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLSR**-NH₂ (Mut4, MM 3654 Да; 1R,25K→S), и Ac-**EWGMAVLWER-NRKLKDLKVLKMLRT**-NH₂ (Mut1, MM 3764 Да).

Таблица 1. Обозначения и некоторые параметры пептидов, использованных в работе

Пептид	Аминокислотная последовательность	ММ, Да	Модификации CRAC-мотивов	Особенности пептидов
P4	Ac- RTKLWEMLV ELGNMDK AVKLWRK LKR-NH ₂	3764	—	“Родительский” пептид с двумя CRAC-мотивами [28].
Mut2	Ac- STKLSEMLSEL GNMDK ASKLSR KLSR-NH ₂	3434	5, 21W→S, 9, 18V→S, 1R,25K→S	Та же первичная структура, что у P4, но с заменами всех мотивообразующих аминокислот в обоих CRAC-мотивах.
Mut3	Ac- RTKLSEMLY ELGNMDK AVKLSR KLKR-NH ₂	3525	5, 21W→S	Та же первичная структура, что у P4, но с заменами ароматической аминокислоты (Trp) в обоих CRAC-мотивах.
Mut4	Ac- STKLWEMLV ELGNMDK AVKLWR KLSR-NH ₂	3654	R/K→S 1R,25K→S	Та же первичная структура, что у P4, но с заменами катионных аминокислот (Arg, Lys) в обоих CRAC-мотивах.
Mut1	Ac-EWGMA VLWERN NRKLKDKLVKMLRT-NH ₂	3764	Новый CRAC-мотив	Тот же аминокислотный состав, что у P4, но в случайном порядке (“scramble”); один CRAC-мотив, отличный от мотивов в P4.

Примечание. Все пептиды содержат 26 аминокислотных остатков. Подчеркиванием выделены CRAC-мотивы (как интактные, так и модифицированные). Интактным CRAC-мотивом считается пептид с последовательностью L/V-(X)₍₁₋₅₎-Y/W-(X)₍₁₋₅₎-R/K [22, 24]. Жирным шрифтом показаны мотивообразующие аминокислоты – как исходные, так и замещенные.

Все пептиды (чистота ≥95%) были синтезированы в Синевро (Synagro Co. Ltd., Россия). Пептид P4 (“родительский”) был сконструирован ранее на основании комбинации двух α-спиральных CRAC-содержащих фрагментов белка M1 вируса гриппа [27, 28]. Пептид Mut1 состоял из тех же 26 аминокислот, что и P4, но в случайном порядке (“scramble”), и содержал один случайно образованный CRAC-мотив, отличный от CRAC-мотивов пептида P4. В пептидах Mut2, Mut3 и Mut4 были модифицированы только CRAC-мотивы, в остальном аминокислотная последовательность была такой же, как у пептида P4. У Mut2 в обоих CRAC-мотивах были заменены серином все мотивообразующие аминокислоты – валин, триптофан, аргинин и лизин (V → S, W → S, R/K → S); у Mut3 в обоих CRAC-мотивах серином была заменена только ароматическая аминокислота триптофан (W → S), и у Mut4 серином были заменены только катионные аминокислоты аргинин и лизин (R/K → S). Список пептидов и их основные параметры приведен в табл. 1. У всех пептидов C-конец ацетилирован. В предыдущей работе [28] мы использовали неацетилированный пептид P4; кривые дозозависимости эффектов ацетилированной и неацетилированной формы P4 существенно не различались. Перед экспериментом готовили концентрированные растворы пептидов (от 0.05 до 5 мМ) в диметилсульфоксиде

(DMSO, MP Biomedicals, Франция). При добавлении пептида в инкубационную среду с клетками конечная концентрация DMSO не превышала 1%.

Культура клеток. Опыты проводили на культивируемых клетках IC-21 – иммортализованных перитонеальных макрофагах мыши (ATCC по TIB-186™). Клетки культивировали в модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM, ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия), 2 мМ L-глутамин (ПанЭко) и 40 ед/мл гентамицина (ПанЭко) в атмосфере, содержащей 5% CO₂, при 37°C. Клетки пересеивали дважды в неделю с помощью раствора Версена (ПанЭко). За два дня до экспериментов клетки рассеивали на 6-луночные планшеты (Costar, США) при плотности ~50000 клеток на лунку.

Количественная оценка действия пептидов на активность макрофагов. Активность макрофагов оценивалась по их способности связывать тестовые частицы и измерялась как число ассоциированных с клеткой неопсонизированных латексных 2-мкм частиц на клетку (фагоцитозный индекс) согласно протоколу, описанному ранее [27–31], с небольшими модификациями. Клетки в 6-луночных планшетах предварительно инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ в среде DMEM без сыворотки, чтобы минимизировать ингибирующее действие сыворотки на адгезию

частиц и фагоцитоз [30]. В некоторых опытах во время этой инкубации в среду DMEM добавляли метил- β -циклодекстрин (мБЦД; Sigma, США). После предварительной инкубации в бессывороточной среде к клеткам в лунки добавляли 1 мг/мл альбумин (Sigma) и исследуемый пептид (из концентрированного раствора в DMSO) в конечной концентрации от 0.5 до 50 мкМ, а также флуоресцентные частицы (Fluoresbrite Carboxy YG 2.0 Microspheres, Polysciences, Inc., США) в количестве 8×10^6 частиц на лунку. Контролем служили клетки, к которым вместо пептида добавляли DMSO в соответствующей концентрации (0.5–1%). Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 1 ч, затем дважды промывали физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS) для удаления неприкрепившихся частиц и фиксировали 2.5% раствором (в PBS) глутарового альдегида (Ted Pella, США).

Активность клеток оценивалась по числу частиц, связанных с клеткой. Адгезия частицы на поверхности фагоцита предшествует фагоцитозу, зависит от доступности фагоцитозных рецепторов, включая интегрины, и является необходимым условием фагоцитоза [32–36]. Число частиц на клетку определяли по методике, описанной ранее [27–31]. С помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), оснащенного цифровой видеокамерой ORCAII-ERG2 (Hamamatsu, Япония) и соответствующим программным обеспечением (Axiovision 4.5, Carl Zeiss Imaging), получали микрофотографии клеток в режиме фазового контраста и флуоресценции (возбуждение/эмиссия 490/520 и 520/590 нм для флуоресценции частиц и глутарового альдегида, соответственно). В каждой лунке фотографировали 10–20 случайно выбранных полей зрения. С помощью ImageJ и специально разработанного программного модуля [30, 31] определяли число частиц на клетку для каждого поля зрения; в каждой лунке учитывали по меньшей мере 200 клеток. Для сравнения эффектов пептидов в разных экспериментах число частиц на клетку выражали в процентах от контрольного значения, полученного в данном опыте и принятого за 100%. Поскольку активность клеток IC-21 зависит от плотности культуры [31], мы использовали неплотные культуры (~15–60 клеток на поле зрения, что соответствует примерно 5–20% от плотного монослоя). Данные представлены как среднее \pm SEM; число независимых экспериментов (3–8) указано в подписях к рисункам. Достоверность различий между группами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Статистическую и графическую обработку данных проводили с помощью встроенных программ OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние пептидов на активность макрофагов.

В контрольных условиях число частиц на клетку варьировало в разных экспериментах от 1.5 до 4.2 и в среднем составляло 2.7 ± 0.2 (\pm SE, $n = 27$). Рисунок 1 иллюстрирует влияние пептида P4, содержащего два CRAC-мотива (**RTKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLR**), на эффективность адгезии частиц на поверхности клеток: на рис. 1а приведен репрезентативный эксперимент, на рис. 1б – кривая доза–эффект, полученная на основании 8 независимых опытов. Концентрационная зависимость эффекта пептида P4 имеет хорошо выраженную колоколообразную форму: при 0.5–5 мкМ число частиц на клетку существенно выше контрольного значения (до ~200%); при более высоких концентрациях пептида индекс снижается и при 20–25 мкМ составляет около 50% от контроля (рис. 1б). При 50 мкМ пептид P4 оказывает токсическое действие: во всех опытах при этой дозе P4 практически все клетки погибали (рис. 1в).

Мутантный пептид Mut2 (**STKLSEMLSELGNMDKASKLSRKLSR**), в котором все мотивообразующие аминокислоты в обоих CRAC-мотивах были заменены серином (W \rightarrow S, V \rightarrow S, R \rightarrow S), в диапазоне концентраций от 0.5 до 50 мкМ не вызывал достоверных изменений фагоцитозного индекса и не был токсичен при 50 мкМ (рис. 2а, 2б). Также оказался неэффективным пептид Mut3 (**RTKLSEMLVELGNMDKAVKLSRKLR**), у которого были заменены серином только ароматические аминокислоты в обоих CRAC-мотивах (W \rightarrow S) (рис. 2в, 2г).

Эффекты пептида Mut4 (**STKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLSR**), в CRAC-мотивах которого только катионные аминокислоты (аргинин и лизин) были заменены серином (R/K \rightarrow S), иллюстрирует рис. 3. Как и в случае P4, при низких концентрациях Mut4 значительно увеличивал активность клеток (до ~210% от контроля при 1–4 мкМ); при ~10 мкМ Mut4 фагоцитозный индекс возвращался к контролю, и при 50 мкМ развивался токсический эффект (рис. 3в); в некоторых опытах признаки токсического действия обнаруживались и при 20 мкМ Mut4. В целом, как показывает рис. 3б, концентрационные зависимости эффектов Mut4 и P4 различаются незначительно.

Мутантный пептид Mut1 (**EWGMAVLWERNRKLKDLKVLKMLRT**) был создан из тех же аминокислот, что и родительский пептид P4, но в случайном порядке (“scramble”). Пептид Mut1 содержал один случайный образованный CRAC-мотив (**VLWER**), который отличался от обоих CRAC-мотивов пептида P4 (**RTKLWEMLV** и **VKLWRKLR**). При концентрациях 2–10 мкМ пептид Mut1 умеренно (до ~160% от контроля), но достоверно увеличивал число частиц на клетку;

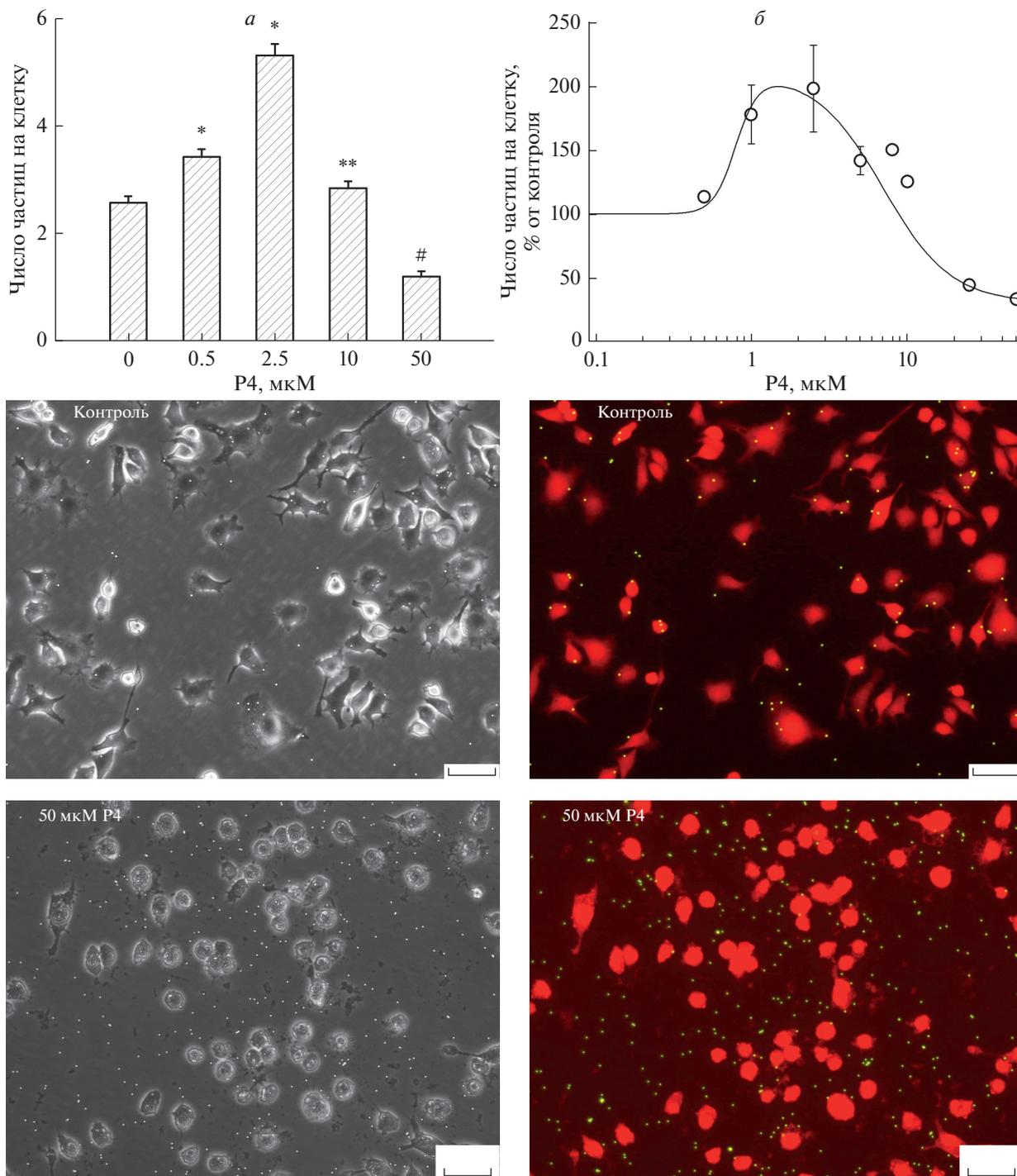


Рис. 1. Влияние пептида P4 (RTKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLR) на активность связывания 2-мкм неопсонированных частиц культивируемыми макрофагами IC-21. *а, б* – Дозозависимость влияния пептида P4 на среднее число связанных клетками частиц. *а* – Репрезентативный эксперимент; каждая точка – среднее число частиц на клетку \pm SE, полученное для ≥ 200 клеток в лунке при данной концентрации пептида. *б* – Кривая доза–эффект для P4, построенная на основании 8 независимых опытов; активность клеток выражена в процентах от контрольного значения в каждом опыте (контрольные условия: вместо пептида добавлен DMSO в соответствующей концентрации, 0.5 или 1% DMSO). Отличие от контроля достоверно по *t*-критерию Стьюдента при $p < 0.001$ (*), $p < 0.05$ (**) или $p < 0.01$ (#). *в* – Микрофотографии клеток, иллюстрирующие токсический эффект 50 мкМ P4; *слева* – фазовый контраст, *справа* – режим флуоресценции (зеленый канал – частицы, красный – глутаровый альдегид). Масштабная полоска – 50 мкм

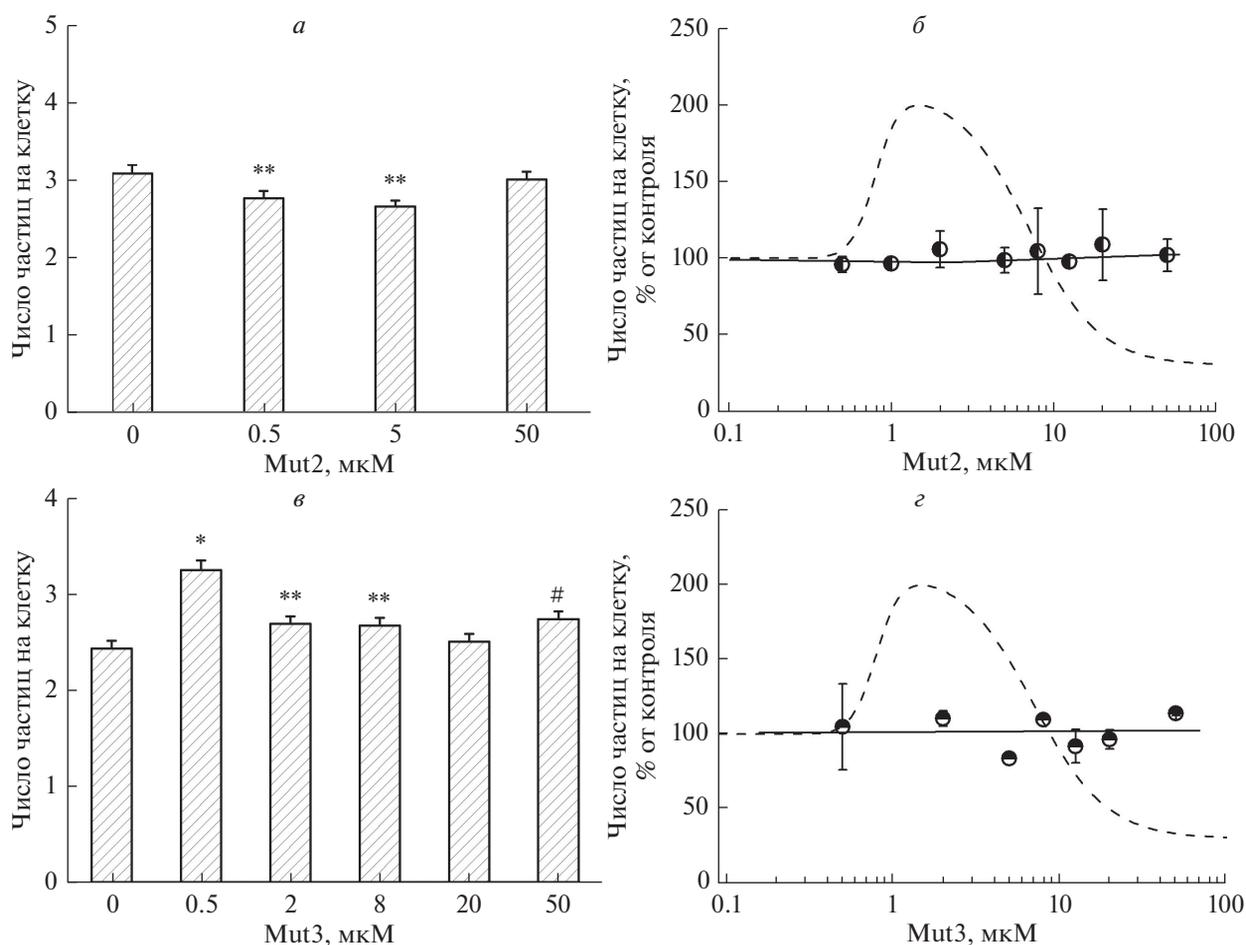


Рис. 2. Мутантный пептид Mut2 (STKLSEMLSELGNMDKASKLSRKLRSR) с заменами всех мотивообразующих аминокислот (W → S, V → S, R/K → S) в CRAC-мотивах (а, б) и мутантный пептид Mut3 (RTKLSEMLVELGNMDKAVKLSRKLKR) с заменами только ароматических аминокислот (W → S) (в, г) в диапазоне концентраций 0.5–50 мкМ не вызывают достоверных изменений активности клеток IC-2. а, в – Репрезентативные эксперименты; одна колонка показывает среднее число частиц на клетку ± SE, полученное для ≥200 клеток в данной лунке; отличие от контроля достоверно по *t*-критерию Стьюдента при $p < 0.001$ (*), $p < 0.05$ (**) или $p < 0.01$ (#). б, г – Кривые доза–эффект для Mut2 (б) и Mut3 (г), построенные на основании 6 независимых экспериментов для каждого пептида; активность клеток выражена в процентах от контрольного значения в каждом опыте (контрольные условия: вместо пептида – DMSO в соответствующей концентрации, 0.5 или 1% DMSO). Для сравнения на графиках (б, г) приведены кривые дозозависимости для пептида P4 (штриховые линии).

максимальный эффект развивался при ~4–5 мкМ (рис. 4б). При более высоких концентрациях этот показатель снижался и при 50 мкМ возвращался к контрольному уровню. В отличие от P4, мутантный пептид Mut1 при 50 мкМ не оказывал токсического действия на клетки (рис. 4в). Таблица 2 обобщает полученные данные об активности исследованных пептидов.

Модулирующее действие метил-β-циклодекстрина на эффекты пептидов P4, Mut4 и Mut1. Ранее мы показали [28], что метил-β-циклодекстрин, экстрагирующий мембранный холестерин [37–40], дозозависимо подавляет стимулирующий эффект, вызываемый пептидом P4 при низких концентрациях, и существенно снижает концентрацию токсического эффекта пептида P4

[28]. В этой работе мы обнаружили, что предварительная инкубация клеток в присутствии метил-β-циклодекстрина сходным образом модулирует эффекты пептидов Mut4 и Mut1 (рис. 5). Важно отметить, что в данной работе мы использовали низкие концентрации мБЦД (<5 мМ), при которых мБЦД сам по себе не только не угнетал активность клеток, но и заметно увеличивал ее. Это явление описано в литературе и может объясняться существованием оптимальной концентрации холестерина и активацией холестерин-зависимых функций клеток при удалении из мембраны “избыточного” холестерина [19, 41]. В нашей системе стимулирующий эффект при низкой концентрации мБЦД можно объяснить перераспределением холестерина, экстрагированного циклодекстрином [37–

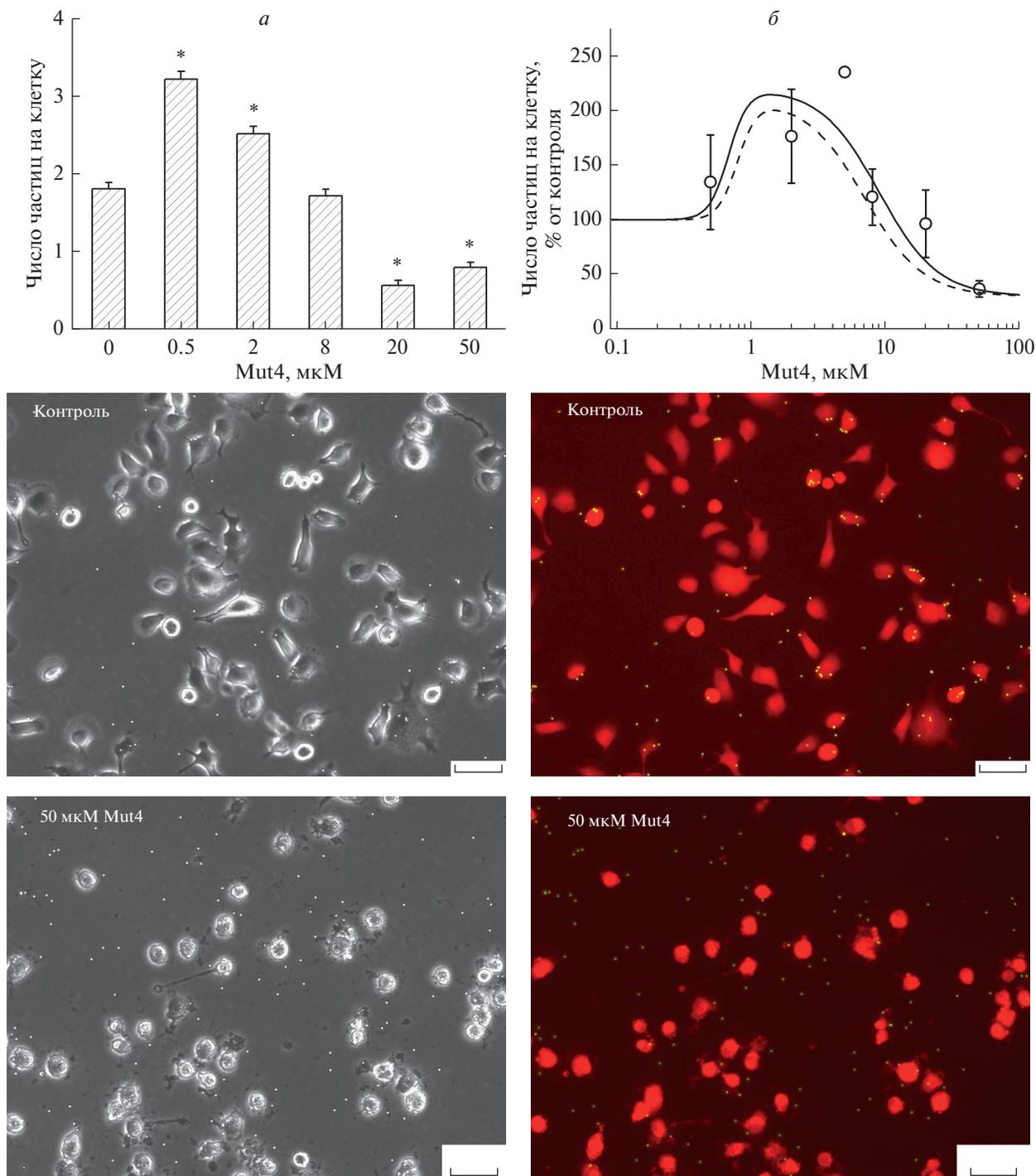


Рис. 3. Влияние на активность макрофагов IC-21 мутантного пептида Mut4 (STKLWEMLVELGNMDKAV KLWRKLSR) с заменами только катионных аминокислот в обоих CRAC-мотивах (R/K \rightarrow S) сходно с эффектом пептида P4. *a, б* – Концентрационная зависимость влияния пептида Mut4 на среднее число связанных с клетками частиц. *a* – Репрезентативный эксперимент; каждая точка – среднее число частиц на клетку \pm SE, полученное для ≥ 200 клеток в лунке при данной концентрации пептида; отличие от контроля достоверно по *t*-критерию Стьюдента при $p < 0.001$ (*). *б* – Кривая доза–эффект для Mut4, построенная на основании 6 независимых опытов; активность клеток выражена в процентах от контрольного значения в каждом опыте (контрольные условия: вместо пептида – 1% DMSO); для сравнения приведена кривая дозозависимости для пептида P4 (штриховая линия). *в* – Микрофотографии клеток, иллюстрирующие токсический эффект пептида Mut4; *слева* – фазовый контраст, *справа* – режим флуоресценции (зеленый канал – частицы, красный – глутаровый альдегид). Масштабная полоска – 50 мкм

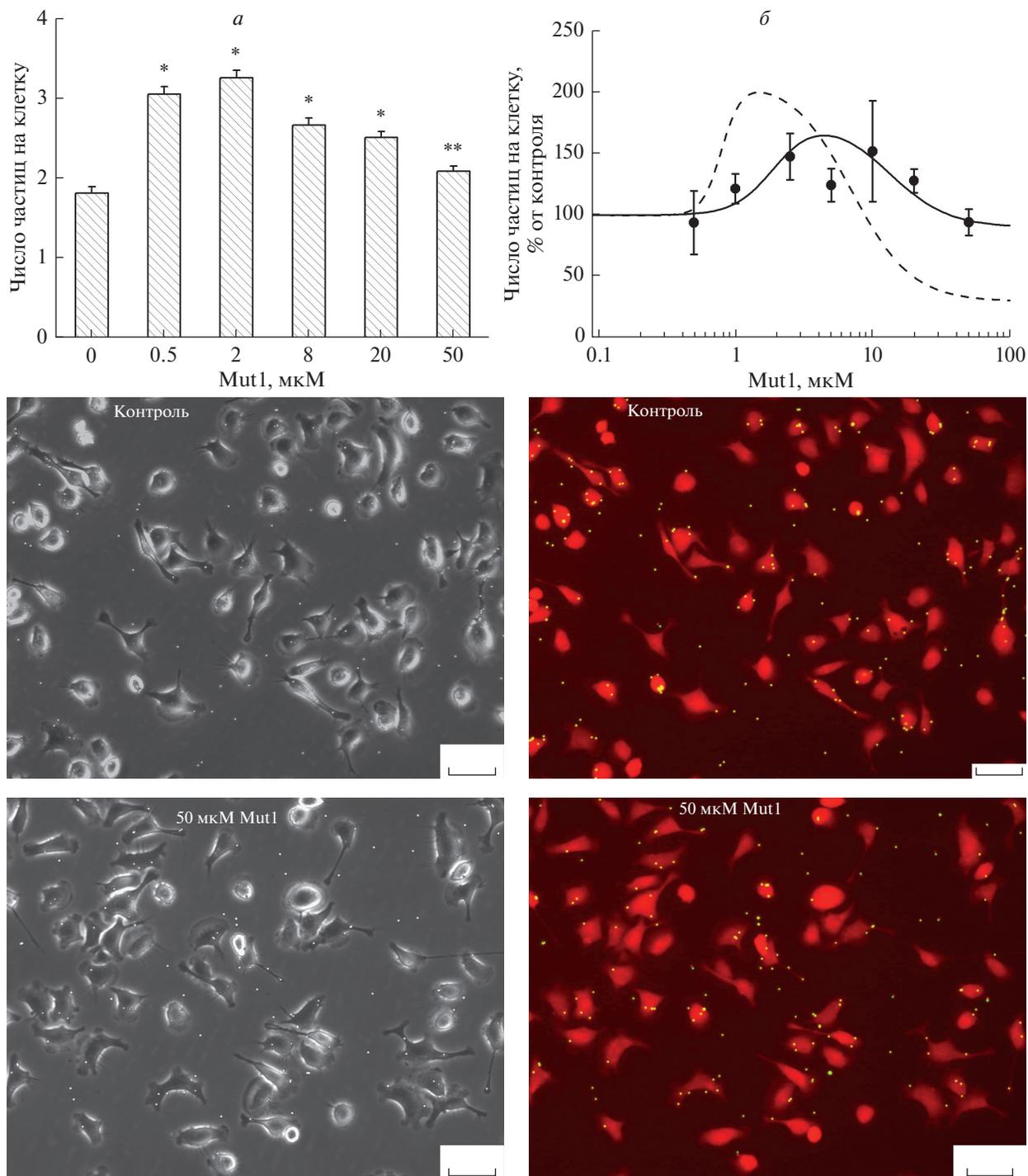


Рис. 4. Влияние на активность макрофагов IC-21 мутантного пептида Mut1 (EWGMAVLWERNRKLKDLKVLKMLRT). *а* – Репрезентативный эксперимент; каждая точка – среднее число частиц на клетку \pm SE, полученное для ≥ 200 клеток в лунке при данной концентрации пептида; отличие от контроля достоверно по *t*-критерию Стьюдента при $p < 0.001$ (*) или $p < 0.05$ (**). *б* – Кривая доза–эффект для Mut1, построенная на основании 7 независимых опытов; активность клеток выражена в процентах от контрольного значения в каждом опыте (контрольные условия: вместо пептида – 1% DMSO); для сравнения приведена кривая дозозависимости для пептида P4 (штриховая линия). *в* – Микрофотографии клеток, иллюстрирующие отсутствие токсического эффекта при 50 мкМ Mut1: *верхний ряд* – контроль, *нижний ряд* – присутствию 50 мкМ Mut1; *слева* – фазовый контраст, *справа* – режим флуоресценции (зеленый канал – частицы, красный – глутаровый альдегид). Масштабная полоска – 50 мкм

Таблица 2. Эффекты исследованных пептидов в диапазоне концентраций 0.5–50 мкМ

Пептид	Стимулирующий эффект	Токсический эффект
P4 (родительский)	~200% (1–2 мкМ)*	~50 мкМ
Mut1 (“scramble” с одним CRAC-мотивом)	~160% (4–10 мкМ)*	–
Mut2 (замены всех мотивообразующих аминокислот в CRAC-мотивах)	–	–
Mut3 (замены только ароматических аминокислот в CRAC-мотивах)	–	–
Mut4 (замены только катионных аминокислот в CRAC-мотивах)	~210% (1–4 мкМ)*	20–50 мкМ

*Максимальный эффект в % от контрольного уровня, в скобках – концентрация пептида в области максимального эффекта

39], из клеток с высоким содержанием холестерина в клетки с его низким содержанием. Такое перераспределение должно приводить к снижению доли плохо работающих клеток с “избыточным” холестерином и повышению доли клеток, имеющих достаточно холестерина для нормальной работы холестерин-зависимых рецепторов, необходимых для связывания частиц клетками.

В опыте, представленном на рис. 5а, 2.5 мкМ пептид P4 дает характерную мощную стимуляцию (второй столбик); 2 мМ мБЦД немного (на ~20%), но достоверно ($p < 0.05$) увеличивает число частиц на клетку по сравнению с контролем (третий столбик); но ответ обработанных 2 мМ мБЦД клеток на 2.5 мкМ пептид P4 (четвертый столбик) значительно ослаблен (на ~60%, $p < 0.001$) по сравнению с ответом не обработанных циклодекстрином клеток на P4. Сходная картина наблюдается в случае пептидов Mut4 (рис. 5б) и Mut1 (рис. 5в). При концентрации 2 мкМ Mut4 вызывает значительное увеличение числа частиц на клетку (до ~200% от контроля, $p < 0.001$; рис. 5б). Но если пептид добавляли после обработки клеток 2 мМ мБЦД, то стимулирующий эффект 2 мкМ пептида Mut4 был на 40% слабее ($p < 0.005$), чем у клеток, не обработанных мБЦД. В случае Mut1 (рис. 5в) мБЦД также подавлял стимулирующий эффект пептида. В опыте, представленном на рис. 5в, в отсутствие мБЦД пептид Mut1 при концентрации 2 мкМ стимулировал активность клеток до 134% от контроля. У клеток, инкубированных в присутствии 3.7 мМ мБЦД без пептида, активность составляла 121% от контроля ($p < 0.001$). При добавлении 2 мкМ Mut1 после инкубации клеток с 3.7 мМ мБЦД активность клеток была достоверно ниже, чем у клеток при той же концентрации пептида в отсутствие мБЦД (на 30%, $p < 0.001$). В целом, эти результаты показывают, что инкубация клеток в присутствии экстрагирующего холестерин агента мБЦД в концентрации, при которой активность клеток увеличивается, приводит к подавлению стимулирующих эффектов пептидов P4, Mut4 и Mut1. Подавление актив-

ности клеток при сочетании пептида и мБЦД в стимулирующих концентрациях, указывает на то, что механизмы эффектов пептидов и мБЦД взаимосвязаны; в противном случае стимулирующие эффекты должны были бы складываться. Мы предполагаем, что вызванная мБЦД модуляция эффектов пептидов связана именно с изменением концентрации холестерина в клеточных мембранах.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе исследовалась роль CRAC-мотивов и мотивообразующих аминокислот в эффектах пептида P4 (Ac-RTKLWEMLVELGNMD-KAVKLWRKLR-NH₂), содержащего два холестерин-распознающих мотива. Ранее мы показали [28], что этот пептид дозозависимо влияет на активность культивируемых макрофагов IC-21, оцениваемую по их способности связывать 2-мкм частицы: при низких концентрациях (порядка 1 мкМ) P4 оказывал стимулирующее действие на клетки и был токсичен при высоких концентрациях (50 мкМ) (рис. 1, [28]). Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что модификации CRAC-мотивов в пептиде P4 существенно влияют на способность пептида модулировать активность клеток IC-21. Так, замена в пептиде P4 всех мотивообразующих аминокислот (V → S; W → S; R/K → S) приводит к полной потере активности пептида: мутантный пептид Mut2 (табл. 1), отличающийся от P4 только этими аминокислотами, не оказывал существенного влияния на число связанных частиц на клетку (рис. 2а, 2б, табл. 2). Более того, не влиял на активность клеток и мутантный пептид Mut3 (табл. 1) с заменами только триптофанов в CRAC-мотивах (W → S) (рис. 2в, 2г, табл. 2). Интересно, что замена в CRAC-мотивах только катионных аминокислот (R/K → S) практически не влияла на активность пептида: эффекты мутантного пептида Mut4 (табл. 1), отличающегося от P4 только этими аминокислотами, были очень похожи на эффекты «родительского» пептида P4 (рис. 3, табл. 2). Нако-

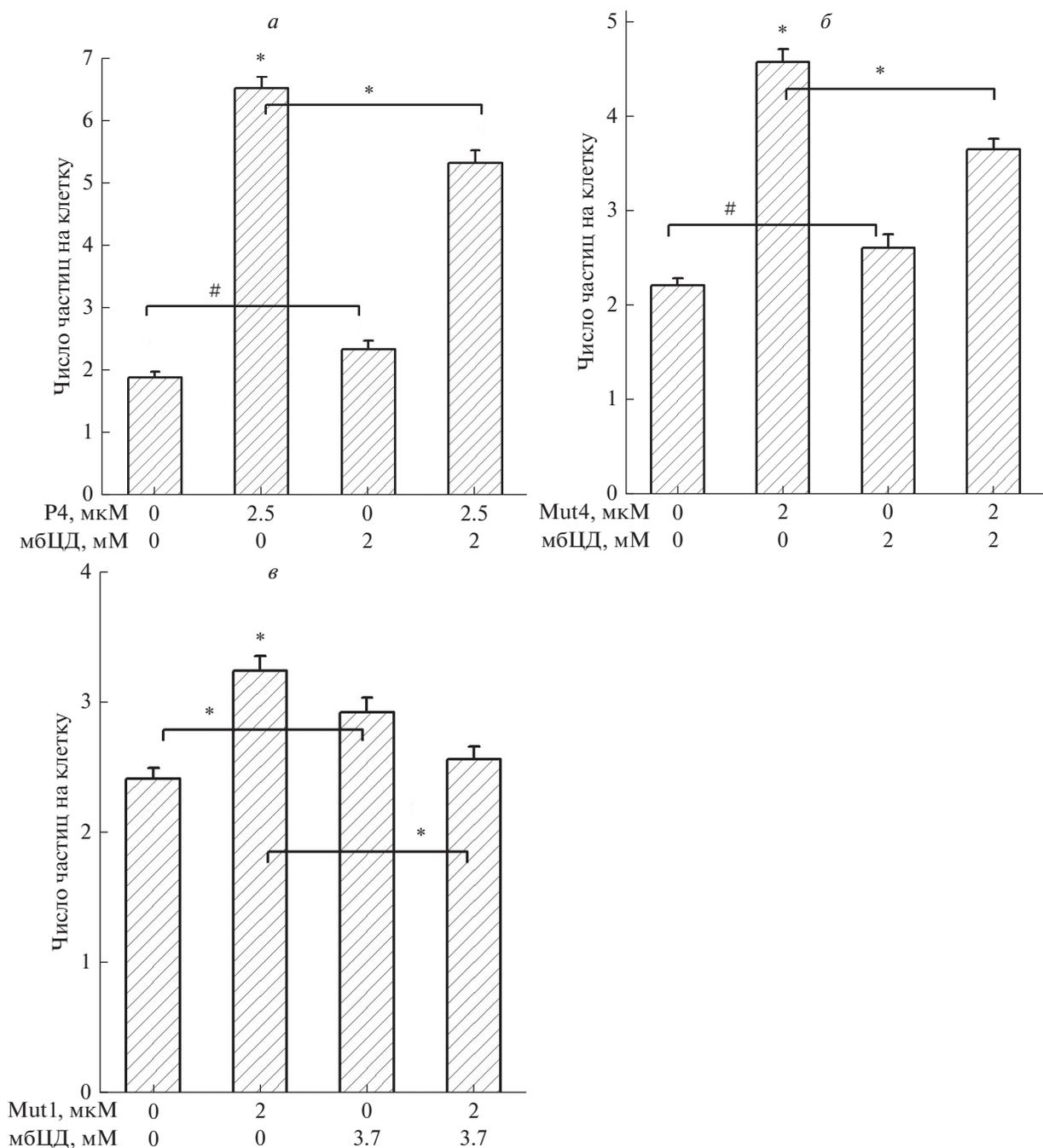


Рис. 5. Предварительная инкубация клеток в присутствии мБЦД подавляет стимулирующее действие пептидов Р4 (а), Mut4 (б) и Mut1 (в). В отсутствие пептидов мБЦД в использованных концентрациях (2 или 3.7 мМ) увеличивает активность клеток. Приведены репрезентативные эксперименты; каждая точка – среднее число частиц на клетку \pm SE, полученное для ≥ 200 клеток в лунке при данной концентрации пептида; отличие от контроля достоверно по *t*-критерию Стьюдента при $p < 0.001$ (*); различия между группами, показанными квадратной скобкой, достоверны при $p < 0.001$ (*) или $p < 0.01$ (#).

нец, мутантный пептид Mut1 (табл. 1), состоящий из тех же аминокислот, что и пептид Р4, но в случайном порядке (“scramble”), и имеющий один случайно образованный CRAC-мотив, отличающийся от CRAC-мотивов родительского пептида Р4, вызывал умеренную стимуляцию клеток при

немного более высоких концентрациях, чем Р4, и не обладал токсическим действием при 50 мкМ (рис. 4, табл. 2).

Предварительная инкубация клеток в присутствии метил- β -циклодекстрина, экстрагирующего мембранный холестерин [37–39], приводила к

подавлению стимулирующих эффектов пептидов Mut4 и Mut1 при низких концентрациях (рис. 5б, 5в), подобно тому как это происходит в случае пептида P4 (рис. 5а; [28]). Как отмечалось выше, вызванное мБЦД угнетение стимулирующего эффекта пептида нельзя объяснить токсическим действием мБЦД, так как в нашей системе мБЦД при концентрациях <5 мМ не только не подавлял, но стимулировал активность клеток (рис. 5). Мы предполагаем, что холестерин-зависимое повышение клеточной активности, вызванное CRAC-содержащими пептидами P4, Mut4, и Mut1 в низкой концентрации, можно объяснить стимуляцией формирования обогащенными холестерином доменов в плазматической мембране, что способствует агрегации рецепторов, ответственных за связывание частиц [32–36]. Ослабление стимуляции и угнетение активности клеток при дальнейшем увеличении концентрации пептида может быть обусловлено конкуренцией CRAC-пептида с холестерин-зависимыми рецепторами за холестерин и нарушением нормального функционирования этих рецепторов [26]. При высоких концентрациях (~50 мкМ) пептиды, содержащие два CRAC-мотива (P4 и Mut4), становятся токсичными (рис. 1в, 3в). В работе [28] мы предположили, что холестерин-зависимый токсический эффект P4 можно объяснить и формированием трансмембранных неселективных пор (например, вследствие олигомеризации молекул пептида), что должно приводить к утечкам внутриклеточного содержимого и гибели клеток; этот же механизм может работать и в случае пептида Mut4. Возможно, пептид Mut1 с одним CRAC-мотивом не способен образовывать трансмембранные поры; также не были токсичны при концентрациях порядка десятков мкМ короткие CRAC-пептиды VLNYVW [29–31] и ATVLNYVWRDNS [26]. Механизмы цитотоксичности CRAC-содержащих пептидов требуют специальных исследований.

Наши результаты согласуются с данными ряда других работ, в которых была осуществлена экспериментальная модуляция холестерин-зависимых клеточных процессов с помощью CRAC-содержащих пептидов и продемонстрирована ключевая роль CRAC-мотивов в этих эффектах [26, 42–46]. Так, в работе Li и др. [26] было показано, что внутриклеточная доставка синтетического CRAC-пептида ATVLNYVWRDNS приводит к нарушению транспорта холестерина в митохондрии и к дозозависимому угнетению синтеза стероидных гормонов в клетках Лейдига, а при замене мотивообразующих аминокислот пептид теряет активность. В ряде работ подчеркивается ключевая роль ароматической аминокислоты в CRAC-мотиве; это может быть как тирозин, так и триптофан или фенилаланин (см. обзоры [24, 25]). Наши данные подтверждают, что присутствие триптофана в CRAC-мотивах исследованного

пептида P4 критично для активности пептида. Роль триптофана как ключевой мотивообразующей ароматической аминокислоты CRAC-пептидов показана в ряде работ [45–47]. Значение катионных аминокислот в холестерин-зависимом эффекте CRAC-содержащего пептида P4 в нашей экспериментальной системе не столь очевидно и требует уточнения. Мутантный пептид Mut4 с заменами катионных аминокислот в CRAC-мотивах был практически так же активен в отношении клеток IC-21, как и P4 (рис. 3, табл. 2). Ранее было показано, что пептид VLNYVW, представляющий собой фрагмент CRAC-мотива без катионной аминокислоты, холестерин-зависимо модулирует активность культивируемых макрофагов IC-21 [29–31]. Согласно Azarashvili и др. [48], этот же пептид предотвращает открывание неселективной митохондриальной поры (mPTP) и освобождение цитохрома *c*, а также других апоптотических факторов у выделенных из мозга крысы митохондрий.

Использованный в нашей работе пептид P4 был сконструирован на основе CRAC-содержащих альфа-спиралей белка M1 вируса гриппа [27], и тот факт, что пептид P4 модулирует активность макрофагов, указывает на то, что подобные модуляции могут иметь место и в целом организме, инфицированном вирусом гриппа. Это может означать, что CRAC-содержащие пептиды вирусного происхождения могут составить основу для разработки новых препаратов, регулирующих различные жизненно важные холестерин-зависимые процессы, среди которых значительное место занимают взаимодействия клеток с микробами [9, 13–20]. Возможность влиять на процесс инфицирования клеток *in vitro* с помощью CRAC-содержащего пептида вирусного происхождения была продемонстрирована в работе Cheng и др. [45]. Авторы сообщили, что пептид C5A, содержащий аминокислотные остатки 3–20 из амфипатического α -спирального N-концевого домена белка NS5A вируса гепатита С, подавлял размножение вируса более чем на 5 порядков. Интересно, что авторы не пользуются понятием CRAC-мотива, но присутствие этого мотива в пептиде C5A очевидно: SWLRDIWDWICEVLSDFK [45]. В 2018 г. была продемонстрирована антивирусная активность того же пептида C5A в отношении вируса иммунодефицита человека HIV [46]. Нам представляется заслуживающим внимания тот факт, что так называемый «ароматический домен» S-белка коронавируса SARS [47] также содержит CRAC-мотив (YIKWPWYVW) и что инфицирование этим коронавирусом зависит от холестерина [49]. Мы предполагаем, что создание CRAC-содержащих пептидов, конкурирующих с S-белком за холестерин и препятствующих процессу инфицирования клетки коронавирусом, может быть одним из направлений борьбы с этой

инфекцией. Более того, губительное действие коронавируса при его репликации и формировании оболочки вириона может быть подобно токсическому действию больших доз некоторых CRAC-содержащих пептидов (рис. 1в, 3в; [28]). Токсический эффект CRAC-содержащего коронавируса S-белка внутри клетки может быть связан с секвестрированием холестерина S-белком и нарушением работы холестерин-зависимых белков не только плазматической мембраны, но и мембран внутриклеточных органелл. Предотвратить такую губительную для клетки экстракцию холестерина S-белком также могут специально сконструированные и не обладающие токсичностью CRAC-содержащие пептиды.

В целом, полученные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что: (1) CRAC-мотивы играют существенную роль в механизме эффектов, вызываемых пептидом P4 (RTKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLR), содержащим два CRAC-мотива; (2) из мотивообразующих аминокислот принципиально присутствие ароматической аминокислоты триптофана, замена которого серином в обоих CRAC-мотивах инактивирует пептид; (3) замена катионных аминокислот (аргинина и лизина) не влияет на исследуемые эффекты пептида; (4) для токсического эффекта P4, по-видимому, существенно присутствие двух CRAC-мотивов; (5) эффекты CRAC-содержащих пептидов (P4, Mut4 и Mut1) зависят от содержания холестерина в мембране. Механизмы взаимодействий липидных и белковых компонентов клеточной мембраны с CRAC-содержащими пептидами, модулирующими холестерин-зависимые клеточные функции, а также возможности применения таких пептидов в медицинских целях еще предстоит исследовать.

Авторы выражают благодарность Л.А. Баратовой и В.А. Радюхину за полезное обсуждение проекта. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-01363.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Enkavi G., Javanainen M., Kulig W., Róg T., Vattulainen I. 2019. Multiscale simulations of biological membranes: The challenge to understand biological phenomena in a living substance. *Chem. Rev.* **119**, 5607–5774.
2. Song Y., Kenworthy A.K., Sanders Ch.R. 2014. Cholesterol as a co-solvent and a ligand for membrane proteins. *Protein Science.* **23**, 1–22.
3. Ikonen E. 2008. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9** (2), 125–138.
<https://doi.org/10.1038/nrm2336>
4. Muller M.P., Jiang T., Sun C., Lihan M., Pant S., Mahinthichaichan P., Trifan A., Tajkhorshid E. 2019. Characterization of lipid-protein interactions and lipid-mediated modulation of membrane protein function through molecular simulation. *Chem. Rev.* **119** (9), 6086–6161.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00608>
5. Kiriakidi S., Kolocouris A., Liapakis G., Ikram S., Durdagi S., Mavromoustakos Th. 2019. Effects of cholesterol on GPCR function: Insights from computational and experimental studies. In: *Direct mechanisms in cholesterol modulation of protein function*. Eds Rosenhouse-Dantsker A., Bukiya A.N. Series *Advances in experimental medicine and biology*, vol. 1135. Cham: Springer, p. 89–103.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-14265-0_5
6. Lundbæk J.A., Birn P., Hansen A.J., Søgaard R., Nielsen C., Girshman J., Bruno M.J., Tape S.E., Egebjerg J., Greathouse D.V., Mattice G.L., Koeppe R.E. II, Andersen O.S. 2004. Regulation of sodium channel function by bilayer elasticity: The importance of hydrophobic coupling. Effects of micelle-forming amphiphiles and cholesterol. *J. Gen. Physiol.* **123**, 599–621.
7. Resnik N, de Luca GMR, Sepčić K, Romih R, Manders E, Veranič P. 2019. Depletion of the cellular cholesterol content reduces the dynamics of desmosomal cadherins and interferes with desmosomal strength. *Histochem Cell Biol.* **152** (3), 195–206.
<https://doi.org/10.1007/s00418-019-01797-1>
8. Tabas I. 2010. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **10** (1), 36–46.
<https://doi.org/10.1038/nri2675>
9. Sviridov D., Mukhamedova N., Makarov A.A., Adzhubei A., Bukrinsky M. 2020. Comorbidities of HIV infection: Role of Nef-induced impairment of cholesterol metabolism and lipid raft functionality. *AIDS.* **34**, 1–13.
10. Tang Q., Wang F., Yang J., Peng H., Li Y., Li B., Wang S. 2020. Revealing a novel landscape of the association between blood lipid levels and Alzheimer's disease: A meta-analysis of a case-control study. *Front. Aging Neurosci.* **11**, 370.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00370>
11. Singhal A., Szente L., Hildreth J.E.K., Song B. 2018. Hydroxypropyl-beta and -gamma cyclodextrins rescue cholesterol accumulation in Niemann-Pick C1 mutant cell via lysosome-associated membrane protein 1. *Cell Death Dis.* **9** (10), 1019.
<https://doi.org/10.1038/s41419-018-1056-1>
12. Shi L., Huang L., He R., Huang W., Wang H., Lai X., Zou Z., Sun J., Ke Q., Zheng M., Lu X., Pei Z., Su H., Xiang A.P., Li W., Yao X. 2018. Modeling the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A using patient-specific iPSCs. *Stem Cell Reports.* **10** (1), 120–133.
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.11.013>
13. Nayak D.P., Hui E.K. 2004. The role of lipid microdomains in virus biology. *Subcell Biochem.* **37**, 443–491.
14. Carter G.C., Bernstone L., Sangani D., Bee J.W., Harder T., James W. 2009. HIV entry in macrophages is dependent on intact lipid rafts. *Virology.* **386**, 192–202.

15. Dou X., Li Y., Han J., Zarlenga D.S., Zhu W., Ren X., Dong N., Li X., Li G. 2018. Cholesterol of lipid rafts is a key determinant for entry and post-entry control of porcine rotavirus infection, *BMC Vet. Res.* **14** (1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1366-7>
16. Lafont F., van der Goot F.G. 2005. Bacterial invasion via lipid rafts. *Cellular Microbiol.* **7** (5), 613–620. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00515.x>
17. Gatfield J., Pieters J. 2000. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science.* **288**, 1647–1650.
18. Ouellet H., Johnston J.B., Ortiz de Montellano P.R. 2011. Cholesterol catabolism as a therapeutic target in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiol.* **19** (11), 530–539.
19. Viswanathan G., Jafurulla M., Kumar G.A., Raghunand T.R., Chattopadhyay A. 2015. Dissecting the membrane cholesterol requirement for mycobacterial entry into host cells. *Chemistry and Physics of Lipids.* **189**, 19–27.
20. Peyron P., Bordier C., N'Diaye E.-N., Maridonneau-Parini I. 2000. Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J. Immunol.* **165**, 5186–5191.
21. Sezgin E., Levental I., Mayor S., Eggeling C. 2017. The mystery of membrane organization: Composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 361–374.
22. Li H., Papadopoulos V. 1998. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinol.* **139**, 4991–4997
23. Papadopoulos V., Baraldi M., Guilarte T.R., Knudsen T.B., Lacapere J.J., Lindemann P.L., Norenberg M.D., Nutt D., Weizman A., Zhang M.R., Gavish M. 2006. Translocator protein (18kDa): New nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 402–409.
24. Fantini J., Epand R.M., Barrantes F. J. 2019. Cholesterol-recognition motifs in membrane proteins. In: *Direct mechanisms in cholesterol modulation of protein function*. Eds Rosenhouse-Dantsker A., Bukiya A.N. Series *Advances in experimental medicine and biology*, vol. 1135. Cham: Springer, p. 3–25. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14265-0_1
25. Miller C.M., Brown A.C., Mittal J. 2014. Disorder in cholesterol-binding functionality of CRAC peptides: A molecular dynamics study. *J. Phys. Chem. B.* **118**, 13169–13174.
26. Li H., Yao Z., Degenhardt B., Teper G., Papadopoulos V. 2001. Cholesterol binding at the cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** (3), 1267–1272.
27. Дунина-Барковская А.Я., Вишнякова Х.С., Головкин А.О., Арутюнян А.М., Баратова Л.А., Батищев О.В., Радюхин В.А. 2018. Амфипатические CRAC-содержащие пептиды-фрагменты белка М1 вируса гриппа модулируют холестерин-зависимую активность макрофагов IC-21. *Биохимия.* **83** (8), 1235–1246.
28. Дунина-Барковская А.Я., Вишнякова Х.С., Баратова Л.А., Радюхин В.А. 2019. Модуляция холестерин-зависимой активности макрофагов IC-21 пептидом, содержащим два CRAC-мотива из белка М1 вируса гриппа. *Биол. мембраны.* **36** (4), 271–280.
29. Дунина-Барковская А.Я., Вишнякова Х.С., Чешев Д.А., Чеканов Н.Н., Бужурина И.М. 2006. Действие диметилсульфоксида и холестерин-связывающих пептидов на фагоцитозную активность макрофагов IC-21. *Биол. мембраны.* **24**, 451–456.
30. Головкина М.С., Скачков И.В., Метелев М.В., Кузеванов А.В., Вишнякова Х.С., Киреев И.И., Дунина-Барковская А.Я. 2009. Угнетающее действие сыворотки на фагоцитозную активность макрофагов IC-21. *Биол. мембраны.* **26**, 379–386.
31. Вишнякова Х.С., Киреев И.И., Дунина-Барковская А.Я. 2011. Влияние плотности культуры на параметры фагоцитоза у макрофагов линии IC-21. *Биол. мембраны.* **28**, 387–396.
32. Ueda M.J., Ito T., Ohnishi S., Okada T.S. 1981. Phagocytosis by macrophages. I. Kinetics of adhesion between particles and phagocytes. *J. Cell Sci.* **51**, 173–188.
33. Han J., Hajjar D.P., Tauras J.M., Nicholson A.C. 1999. Cellular cholesterol regulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36. *J. Lipid. Res.* **40**, 830–838.
34. Febbraio M., Hajjar D.P., Silverstein R.L. 2001. CD36: A class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* **108**, 785–791. <https://doi.org/10.1172/JCI200114006>
35. Дунина-Барковская А.Я. 2004. Фагоцитоз – три в одном: эндоцитоз, экзоцитоз, адгезия. *Биол. мембраны.* **21**, 243–270.
36. Oh H., Mohler E.R., Tian A., Baumgart T., Diamond S.L. 2009. Membrane cholesterol is a biomechanical regulator of neutrophil adhesion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1290–1297.
37. Zidovetzki R., Levitan I. 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes.* **1768**, 1311–1324.
38. Kurkov S.V., Loftsson Th. 2013. Cyclodextrins. *Int. J. Pharmaceutics.* **453**, 167–180.
39. Leclercq L. 2016. Interactions between cyclodextrins and cellular components: Towards greener medical applications? *Beilstein J. Org. Chem.* **12**, 2644–2662.
40. Pike, L.J., and Miller, J.M. 1998. Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* **273**, 22298–22304.

41. Kumar G.A., Roy S., Jafurulla M., Mandal C., Chattopadhyay A. 2016. Statin-induced chronic cholesterol depletion inhibits *Leishmania donovani* infection: Relevance of optimum host membrane cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta.* 1858 (9), 2088–2096. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2016.06.010>
42. Koufos E, Chang EH, Rasti ES, Krueger E, Brown AC. 2016. Use of a cholesterol recognition amino acid consensus peptide to inhibit binding of a bacterial toxin to cholesterol. *Biochemistry.* **55** (34), 4787–4797.
43. Rout A.K., Wu X., Starich M.R., Strub M.-P., Hammer J.A., Tjandra N. 2018. The structure of melanoregulin reveals a role for cholesterol recognition in the protein's ability to promote dynein function. *Structure.* **26** (10), 1373–1383. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.07.009>
44. Brown A.C., Balashova N.V., Epan R.M., Epan R.F., Bragin A., Kachlany S.C., Walters M.J., Du Y., Boesze-Battaglia K., Lally E.T. 2013. Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin utilizes a cholesterol recognition/amino acid consensus site for membrane association. *J. Biol. Chem.* **288** (32), 23607–23621. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.486654>
45. Cheng G., Montero A., Gastaminza P., Whitten-Bauer C., Wieland S.F., Isogawa M., Fredericksen B., Selvarajah S., Galloway P.A., Ghadiri M.R., Chisari F.V. 2008. A viral
- cidal amphipathic α -helical peptide that inhibits hepatitis C virus infection in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 3088–3093. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712380105>
46. Galloway P.A., Chatterji U., Kirchoff A., Gandarilla A., Pyles R.B., Baum M.M., Moss J.A. 2018. Protection efficacy of C5A against vaginal and rectal HIV challenges in humanized mice. *Open Virol. J.* **12**, 1–13. <https://doi.org/10.2174/1874357901812010001>
47. Corver J., Broer R., van Kasteren P., Spaan W. 2009. Mutagenesis of the transmembrane domain of the SARS coronavirus spike glycoprotein: Refinement of the requirements for SARS coronavirus cell entry. *Virol. J.* **6**, 230. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-230>
48. Azarashvili T., Krestinina O., Baburina Y., Odinkova I., Akatov V., Beletsky I., Lemasters J., Papadopoulos V. 2016. Effect of the CRAC peptide, VLNYVW, on mPTP opening in rat brain and liver mitochondria. *Int. J. Mol. Sci.* **17** (12). pii: E2096.
49. Glende J., Schwegmann-Wessels C., Al-Falah M., Pfefferle S., Qu X., Deng H., Drosten C., Naim H.Y., Herrler G. 2008. Importance of cholesterol-rich membrane microdomains in the interaction of the S protein of SARS-coronavirus with the cellular receptor angiotensin-converting enzyme 2. *Virology.* **381** (2), 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.08.026>

Modulation of the Cholesterol-Dependent Activity of Macrophages IC-21 by CRAC Peptides with Substituted Motive-Forming Amino Acids

A. Ya. Dunina-Barkovskaya^{1, *} and Kh. S. Vishnyakova²

¹Belozersky Institute of Physico-chemical Biology, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119992 Russia

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119191 Russia

*e-mail: dunina@belozersky.msu.ru

The activity of many membrane proteins, such as receptors, ionic channels, transporters, and enzymes, is cholesterol dependent; however, mechanisms of the cholesterol-dependent regulation of protein functions remain obscure. Recent studies suggest that membrane proteins can directly interact with cholesterol owing to the presence of the cholesterol-recognizing amino-acid consensus (CRAC) motifs. One of the ways to verify and further develop this notion is a design of CRAC-containing peptides and investigation of their effects on cholesterol-dependent cell functions. Previously we showed that a newly constructed peptide **RTKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLR** (peptide P4) containing two CRAC motifs modulates cholesterol-dependent interactions of cultured macrophages IC-21 with 2- μ m particles. In this work, in order to clarify the role of CRAC-forming amino acids, we employed the same experimental system to test the activity of peptides closely related to P4 but with modified CRAC motifs. We found that peptide **STKLSEMLSELGNMDKASKLSRKLSR** (Mut2) analogous to P4, except that all CRAC-forming amino acids were substituted by serine (V \rightarrow S, W \rightarrow S, R \rightarrow S), did not produce any effect in the concentration range 0.5–50 μ M corresponding to the range of the P4 activity. Neither was effective peptide **RTKLSEMLVELGNMDKAVKLSRKLR** (Mut3), in which only aromatic amino acids of the CRAC motifs were substituted (W \rightarrow S). Peptide **STKLWEMLVELGNMDKAVKLWRKLSR** (Mut4), in which only cationic amino acids in the CRAC motifs were changed (R/K \rightarrow S), produced almost the same effect as that of peptide P4 with a bell-shape dose–response curve. At low concentrations (1–4 μ M) Mut4 notably increased the number of beads per cell, at higher concentrations this parameter diminished, and at 50 μ M Mut4 produced a robust toxic effect. Finally, peptide **EWGMAVLWERNRKLKDLKVLKMLRT** (Mut1) composed of the same amino acid residues as P4 but in a random order (“scramble”) and possessing one CRAC motif, different from that in P4, produced a moderate stimulation at 4–10 μ M but was not toxic at 50 μ M. As in the case of peptide P4, the effects of Mut4 and Mut1 depended on the cholesterol content in the cell membrane: after the incubation of cells with cholesterol-extracting agent methyl- β -cyclodextrin stimulatory effects produced by Mut4 and Mut1 at low doses

were suppressed. Our results indicate that CRAC motifs play an important role in the mechanisms of the peptide-induced modulations of cholesterol-dependent cell functions in the experimental system used and that of the three motif-forming amino acids, critical is the presence of aromatic amino acids (W). Further research is required to comprehend the molecular mechanisms of interactions of CRAC-containing peptides with cell membrane components that lead to modulation of cell functions. We anticipate that CRAC-containing peptides may provide a basis for the development of new tools for directed regulation of the activity of target cholesterol-dependent membrane proteins and for the design of new antimicrobial and immunomodulating drugs in particular.

Keywords: peptides, cholesterol, cholesterol-recognizing amino-acid consensus, CRAC-motif, influenza virus protein M1, methyl- β -cyclodextrin, macrophages, phagocytosis, adhesion

ПИСЬМА В РЕДАКЦИЮ

УДК 577.352+115+113+123.5

ВЛИЯНИЕ РАФТОВ ТОНОПЛАСТА НА ИМПОРТ ДНК В МИТОХОНДРИИ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM*)

© 2020 г. Е. С. Клименко^{а, 1}, И. С. Нестеркина^{а, 1}, Н. В. Озолина^{а, *}, В. В. Гурина^а,
М. В. Кулинченко^а, Ю. М. Константинов^{а, **}

^аСибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: ozol@sifibr.irk.ru

**e-mail: yukon48@mail.ru

Поступила в редакцию 26.12.2019 г.

После доработки 10.04.2020 г.

Принята к публикации 15.04.2020 г.

Изучено влияние тонопласта и изолированных из него рафтов на импорт ДНК в митохондрии картофеля (*Solanum tuberosum*). Показано, что добавление рафтов тонопласта в 8 раз увеличивало активность импорта ДНК в митохондрии по сравнению с фракцией вакуолярных мембран, из которых они были выделены.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, митохондрии, ДНК, импорт, тонопласт, липидные рафты

DOI: 10.31857/S0233475520050060

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные экспериментальные данные в настоящее время указывают на то, что нормальное функционирование митохондрий эукариот, включая высшие растения, в значительной степени зависит от физических контактов этих органелл с другими клеточными органеллами, в особенности с мембранами эндоплазматического ретикулума (ЭР), пероксисомами и вакуолями [1–6]. Участки контактов разных типов органелл, получившие название “мембранных контактных сайтов” (МКС), в последние годы интенсивно изучаются [7]. Так, в исследованиях на клетках человека установлен факт значительного содержания в составе МКС стеринов, что позволяет отнести их к так называемым “рафтовым структурам” или “рафтам” [2]. Рафтами принято называть небольшие (10–200 нм), высоко динамичные, обогащенные стеринами и сфинголипидами мембранные домены, принимающие участие, в зависимости от типа контактирующих органелл, в регуляции функций мембранных каналов, импорте липидов, доставке белков из аппарата Гольджи в плазматическую мембрану, внутриклеточной передаче Ca²⁺-сигналов, эндоцитозе и некоторых других процессах [8]. Если в отношении липидного состава рафтов мембран разного происхождения значительных различий не обнаружено, то белковый состав рафтов, определяющий их

функциональную роль, зависит от типа органелл, из мембран которых рафты были выделены [9].

Общепризнано, что одним из важных условий нормального функционирования митохондрий растений является наличие у них мембранных систем транспорта макромолекул (белков, тРНК и ДНК) [10, 11]. Предполагается, что природная способность митохондрий растений к импорту ДНК [11, 12] может иметь прямое отношение к горизонтальному переносу генов в эти органеллы, происходящему со значительно более высокой частотой, чем в ядерный и хлоропластный геномы. Однако в целом, в отличие от импорта белков и тРНК, детальных сведений о биологической роли и мембранном механизме импорта ДНК в митохондрии растений пока не существует.

Ранее нами было обнаружено стимулирующее влияние мембран ЭР на импорт ДНК в изолированные митохондрии растений [13]. Целью данной работы было изучить влияние вакуолярной мембраны и выделенных из нее рафтов на активность импорта ДНК в митохондрии картофеля (*Solanum tuberosum*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение митохондрий из клубней картофеля (*Solanum tuberosum*) осуществляли, как описано в работе [14]. Содержание белка определяли по методу Бредфорда [15]. В качестве субстрата импорта в митохондрии использовали фрагмент ДНК размером 717 п.н., включающий в себя по-

¹ Авторы, внесшие равный вклад в выполнение исследования.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и флуоресцентных зондов

Олигонуклеотид		Нуклеотидная последовательность
COX2	Rev	5'-AGCCTGCAATGTCCGATAAC-3'
	For	5'-ACCATTCGGAAGGTTACTG-3'
	Проба	FAM~5'-TGGTATACAACCTTTGGACCTAACAGCCGGC-3'~FQ
GFP(2)	Rev	5'-CGGGGCATGGCACTCTTGA-3'
	For	5'-CTGTTCTTGGCCACACT-3'
	Проба	Cy5~5'-TGTTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGA-3'~BHQ2

следовательность гена GFP. Для получения митопластов наружную мембрану митохондрий разрушали с помощью осмотического шока: осадок митохондрий ресуспендировали в 1 мл 5 мМ фосфата калия, pH 7.5, инкубировали на льду 5 мин, затем осаждали и промывали в буфере, содержащем 0.3 М сахарозу.

Импорт ДНК в митохондрии проводили согласно описанному ранее протоколу [16]. Инкубацию митохондрий (200 мкг белка в одной пробе) с ДНК проводили в стандартных условиях (25°C при постоянном мягком покачивании) в течение 40 мин в 20 мкл буфера импорта (0.4 М сахарозы, 40 мМ фосфата калия, pH 7.0). Для инкубации с митохондриями рафты и фракцию вакуолярных мембран добавляли в количестве 5 мкг. После инкубации митохондрии дважды отмывали от избытка ДНК в среде инкубации, затем ресуспендировали в исходном объеме буфера импорта и добавляли ДНКазу I (1 ед. акт./проба) (Thermo Scientific) и хлорид магния до конечной концентрации 10 мМ. ДНКазную обработку проводили в течение 20 мин при 25°C, отмывали от ДНКазы центрифугированием и проводили экстракцию нуклеиновых кислот. Для выделения тотальной ДНК из митохондрий использовали метод термообработки изолированных митохондрий, как описано в [16]. Анализ активности импорта ДНК в митохондрии проводили с использованием метода мультиплексной количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) и программного обеспечения CFX 96 (BioRad). Активность импорта, определяемая как количество чужеродной ДНК, поглощенной митохондриями за фиксированный период времени, оценивали в условных единицах, полученных нормированием в каждом образце показателей уровней амплификации гена *GFP* (GenBank: U73901.1) и митохондриального гена *COX2* (GenBank: DQ185064.1) (табл. 1).

Вакуолярные мембраны получали из находящихся на стадии покоя корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) методом [17]. Чистоту мембранных фракций оценивали при помощи таких специфических ингибиторов H⁺-АТФ-аз F-, Р- и V-типа, как азид натрия, ванадат натрия и бафиломицин. Рафты выделяли по методу [18]. Материал, полученный после высокоскоростного центрифугирования, делили на зоны. В экспериментах использовали везикулы вакуолярной мембраны и зону, которая, как нами ранее установлено [18], содержала рафты.

Используемые фракции перед экспериментами промывали буферным раствором, содержащим 300 мМ сахарозу, 10 мМ фосфат калия, 1 мМ EDTA, 5 мМ глицин (pH 7.5) и осаждали центрифугированием при 100 000 g.

Статистическую обработку результатов проводили с применением программы SigmaPlot 12.5. Полученные данные представлены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение. Для доказательства наличия значимых различий между средними проводили анализ с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами установлено, что добавление рафтовых структур тонопласта в систему митохондриального импорта ДНК приводило к существенному (в 8 раз) увеличению активности импорта ДНК в эти органеллы по сравнению с эффектом вакуолярной мембраны, из которой они были выделены (рис. 1). Мы полагаем, что при добавлении рафтов к митохондриальной суспензии создаются условия в некоторой степени аналогичные условиям *in vivo*, при которых формируются МКС между митохондриями и вакуолями. Одним из

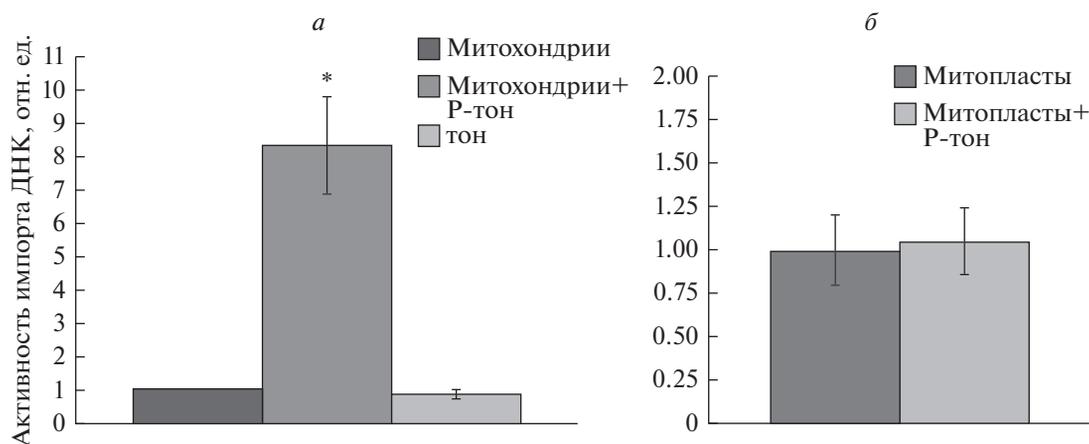


Рис. 1. Влияние рафтов тонопласта и вакуолярной мембраны на активность импорта ДНК в митохондрии (а) и митопласты (б). Условные обозначения: митохондрии – контроль; митохондрии + Р-тон – митохондрии + рафты тонопласта; тон – митохондрии + тонопласт; митопласты + Р-тон – митопласты + рафты тонопласта. * $p < 0.05$, $M \pm SD$, $n = 3$.

вероятных последствий, происходящих при этих структурных изменениях наружной и внутренней митохондриальных мембран, может быть активация работы мембранных каналов, обеспечивающих перенос молекул ДНК в эти органеллы. Ранее экспериментально продемонстрировано существование МКС между митохондриями и вакуолями [6]. Из полученных в данной работе результатов следует, что ключевую роль в формировании контактных сайтов между митохондриями и тонопластом играют, по-видимому, компоненты наружной мембраны митохондрий, поскольку присутствие рафтов в среде инкубации оказывало активирующий эффект только на импорт ДНК в митохондрии, но не в митопласты (митохондрии, лишённые наружной мембраны) (рис. 1).

Важно отметить, что существует определенное сходство в механизмах импорта стерина и ДНК в митохондрии, состоящее в участии в этих процессах таких переносчиков, как порин (VDAC) наружной митохондриальной мембраны и аденин-нуклетидтранслоказа (ANT) внутренней митохондриальной мембраны [12, 19, 20]. В случае импорта стерина установлено, что в состав транспортного комплекса помимо VDAC и ANT входит периферический бензодиазепиновый рецептор (PBR), именуемый в последнее время транслокаторным белком TSPO [20, 21]. Ранее уже высказывалась гипотеза о важной роли PBR/TSPO в импорте ДНК в митохондрии животных [22]. В связи с этим нельзя исключать, что такие компоненты рафтов, как стеринины могут выступать в качестве активатора субстратного типа при работе транспортосомного комплекса PBR/TSPO-VDAC-ANT в данном случае в отношении импорта ДНК в митохондрии.

Ранее показано, что предшественник β -субъединицы АТР-синтазы принимает участие в переносе ДНК через наружную мембрану митохондрий [11]. В составе многочисленных белков рафтов тонопласта содержится также и β -субъединица АТР-синтазы [23]. Таким образом, данный белок мог также служить одним из факторов, вызывающих эффект активации импорта ДНК в митохондрии.

Примечательно, что добавление к митохондриям собственно вакуолярной мембраны не оказывало какого-либо влияния на импорт ДНК (рис. 1а). Это можно объяснить тем, что тонопласт и его рафты мы вносили в систему митохондриального импорта ДНК *in organello* в равных по содержанию белка количествах. Однако очевидно, что в рафтах тонопласта липиды и белки, оказывающие влияние на мембранный механизм импорта ДНК, содержатся в существенно большем количестве, чем в тонопласте.

Таким образом, в настоящей работе впервые установлено, что в системе *in organello* добавление рафтов тонопласта вызывает значительное возрастание активности импорта ДНК в митохондрии *Solanum tuberosum*. Обнаруженный эффект, по-видимому, связан с активирующим влиянием структурных компонентов рафтов на работу транспортных систем митохондрий, которые задействованы в импорте ДНК. Важно подчеркнуть, что в случае добавления рафтов к митохондриям, лишённым наружной мембраны, активации импорта ДНК в органеллы не наблюдалось (рис. 1б), что указывает на необходимость наружной мембраны для проявления обнаруженного эффекта. Выяснение молекулярной природы активации митохондриального импорта ДНК в

присутствии рафтов требует проведения дополнительных исследований.

Работа выполнена с частичным использованием средств грантов МК-6666.2020.11, РФФИ № 18-04-00603 и 19-04-00013 на оборудовании ЦКП “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stacchiotti A., Favero G., Lavezza A., Garcia-Gomez R., Monsalve M., Rezzani R. 2018. Perspective: Mitochondria-ER contacts in metabolic cellular stress assessed by microscopy. *Cells*. **8**, 1–9.
2. Fujimoto M., Hayashi T., Su T.P. 2012. The role of cholesterol in the association of endoplasmic reticulum membranes with mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**, 635–639.
3. Janikiewicz J., Szymanski J., Malinska D., Patalas-Krawczyk P., Michalska B., Duszynski J., Giorfi C., Bonora M., Dobrzyn A., Wieckowski M.R. 2018. Mitochondria-associated membranes in aging and senescence: Structure, function, and dynamics. *Cell Death Disease*. **9**, 1–12.
4. Camões F., Bonekamp N.A., Delille H.K., Schrader M. 2009. Organelle dynamics and dysfunction: A closer link between peroxisomes and mitochondria. *J. Inherit. Metab. Dis.* **32**, 163–180.
5. Shai N., Schuldiner M., Zalckvar E. 2016. No peroxisome is an island—Peroxisome contact sites. *Biochim. Biophys. Acta*. **1863**, 1061–1069.
6. Honscher C., Mari M., Auffarth K., Bohnert M., Griffith J., Geerts W., van de Laan M., Cabrera M., Reggiori F., Ungermann C. 2014. Cellular metabolism regulates contact sites between vacuoles and mitochondria. *Dev. Cell*. **30** (1), 86–94.
7. Ilacqua N., Sanchez-Alvarez M., Bachmann M., Costanti V., Del Pozo M.A., Giacomello M. 2017. Protein localization at mitochondria-ER contact sites in basal and stress conditions. *Front. Cell Develop. Biol.* **5**, 1–14.
8. Pike L.J. 2006. Rafts defined: A report on the Keystone Symposium on lipid rafts and cell function. *J. Lipid Res.* **47** (7), 1597–1598.
9. Simons K., Sampaio J.L. 2011. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* **3** (10), 1–17.
10. Верещагина Н.А., Константинов Ю.М., Каменский П.А., Мазунин И.О. 2018. Импорт белков и нуклеиновых кислот в митохондрии. *Биохимия*. **83** (6), 816–838.
11. Weber-Lotfi F., Koulintchenko M.V., Ibrahim N., Hammann P., Milesina D.V., Konstantinov Yu.M., Dietrich A. 2015. Nucleic acid import into mitochondria: New insights into the translocation pathways. *Biochim. Biophys. Acta*. **1853**, 3165–3181.
12. Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. 2003. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex. *EMBO J.* **22** (6), 1245–1254.
13. Клименко Е.С., Шмаков В.Н., Болотова Т.А., Суббота И.Ю., Тарасенко В.И., Кулинченко М.В., Константинов Ю.М. 2018. Изучение роли взаимодействия мембран митохондрий и эндоплазматического ретикулума в импорте ДНК. *Материалы докладов II Всероссийской научной конференции “Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки”*. Иркутск. 49–51.
14. Neuburger M. 1982. Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll. *Arch. Biochem. Biophys.* **217** (1), 312–323.
15. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** (1–2), 248–254.
16. Клименко Е.С., Милейко В.А., Морозкин Е.С., Лактионов П.П., Константинов Ю.М. 2011. Характеристика импорта и экспорта ДНК в митохондриях картофеля (*Solanum tuberosum*) с использованием метода количественной ПЦР. *Биол. мембраны*. **28** (3), 199–205.
17. Саляев Р.К., Кузеванов В.Я., Хаптагаев С.Б., Копытчук В.Н. 1981. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений. *Физиология растений*. **28** (6), 1295–1306.
18. Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Kolesnikova E.V., Salyaev R.K., Nurminsky V.N., Rakevich A.L., Martynovich E.F., Chernyshov M.Y. 2013. Tonoplast of *Beta vulgaris* L. contains detergent-resistant membrane microdomains. *Planta*. **237** (3), 859–871.
19. Константинов Ю.М., Дитриш А., Вебер-Лотфи Ф., Ибрагим Н., Клименко Е.С., Тарасенко В.И., Болотова Т.А., Кулинченко М.В. 2016. Импорт ДНК в митохондрии. *Биохимия*. **81**, 1307–1321.
20. Flis V.V., Daum G. 2013. Lipid transport between the endoplasmic reticulum and mitochondria. In: *The endoplasmic reticulum. A subject collection from Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Eds. Ferro-Novick S., Rapoport T.A., Schekman R. Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 109–130.
21. McEnery M.W., Snowman A.M., Trifiletti R.R., Snyder S.H. 1992. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: Association with the voltage-dependent anion channel and adenine nucleotide carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3170–3174.
22. Zorov D.B. 1996. Mitochondrial transport of nucleic acids. Involvement of the benzodiazepine receptor. *Biochemistry (Moscow)*. **61**, 939–946.
23. Yoshida K., Ohnishi M., Fukao Y., Okazaki Y., Fujiwara M., Song C., Nakanishi Y., Saito K., Shimmen T., Suzaki T., Hayashi F., Fukaki H., Maeshima M., Mimura T. 2013. Studies on vacuolar membrane microdomains isolated from Arabidopsis suspension-cultured cells: Local distribution of vacuolar membrane proteins. *Plant Cell Physiol.* **54** (10), 1571–1584.

The Effect of Tonoplast Rafts on the DNA Import into Potato (*Solanum tuberosum*) Tuber Mitochondria

E. S. Klimenko¹, I. S. Nesterkina¹, N. V. Ozolina^{1,*}, V. V. Gurina¹,
M. V. Koulintchenko¹, and Yu. M. Konstantinov^{1, **}

¹*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

**e-mail: ozol@sifibr.irk.ru*

***e-mail: yukon48@mail.ru*

The effects of tonoplasts and rafts isolated from tonoplasts on the import of DNA into mitochondria of potato (*Solanum tuberosum*) was studied. It was shown that the presence of tonoplast rafts produced a 8-fold increase in the activity of the DNA import into mitochondria as compared with the effect of the fraction of vacuolar membranes, from which rafts were isolated.

Keywords: *Solanum tuberosum*, mitochondria, DNA, import, tonoplast, lipid rafts