СОДЕРЖАНИЕ

Том 46, номер 4, 2020

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

Инженерия противомикробных пептидов: рациональный дизайн, синтез и синергетические эффекты (Обзорная статья)	
Ya'u Sabo Ajingi, Nujarin Jongruja	339
Экспериментальные методы исследования механизма взаимодействия липидных мембран с низкомолекулярными лекарствами (Обзорная статья)	
И. М. Ле-Дейген, А. А. Скуредина, Е. В. Кудряшова	340
Флуоресцентные метки в биологии. Пространственная организация (Мини-обзор)	
Н. В. Плетнева, Е. А. Горячева, И. В. Артемьев, С. Ф. Архипова, В. З. Плетнев	360
Значение pH-сенсоров в поддержании гомеостаза нервной системы (Обзорная статья)	
О. В. Серова, Е. А. Ганцова, И. Е. Деев, А. Г. Петренко	369
Оптимизация твердофазного синтеза инграмона – пептидного антагониста моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1) человека	
М. В. Сидорова, У. С. Дудкина, Д. В. Авдеев, М. Е. Палькеева, А. С. Молокоедов, М. В. Овчинников, А. А. Азьмуко, С. Б. Гречишников, Е. В. Кудрявцева, В. Н. Бушуев, Т. И. Арефьева	385
Цитоскелетный белок зиксин модулирует экспрессию генов-мишеней Shh сигнального каскада в клетках нервной пластинки эмбрионов шпорцевой лягушки <i>Xenopus laevis</i>	
Н. Ю. Мартынова, Е. А. Паршина, Ф. М. Ерошкин, А. Г. Зарайский	396
Антирадикальная и антимикробная активность тиосемикарбазидных и 1,2,4-триазольных производных гидроксибензойной кислоты	
Ж. Б. Сатпаева, З. Т. Шульгау, С. Б. Ахметова, О. А. Нуркенов, С. Д. Фазылов, М. Ж. Буркеев	404
Структура <i>n</i> -хлорбензойной кислоты по данным рентгеноструктурного анализа и расчета методом DFT, а также расчет <i>in silico</i> молекулярного докинга кислоты с ферментом танкираза I	
Doaa S El Sayed, Sabine Foro	410
Метод термической диссоциации для проведения селекции ДНК-аптамеров	
С. А. Лапа, В. Е. Шершов, Г. С. Краснов, О. С. Волкова, В. Е. Кузнецова, С. П. Радько, А. С. Заседателев, А. В. Чудинов	411
Одновременное применение Су5-модифицированных производных дезоксиуридина и дезоксицитидина в ПЦР	
С. А. Лапа, Т. О. Гусейнов, А. С. Павлов, В. Е. Шершов, В. Е. Кузнецова, А. С. Заседателев, А. В. Чудинов	418
Исследование структурной организации активного центра немодифицированной рекомбинантной сульфатазы из мицелиального гриба <i>Fusarium proliferatum</i> LE1	
Н. В. Колчина, Г. Н. Рычков, А. А. Кульминская, Ф. М. Ибатуллин, М. Г. Петухов, К. С. Бобров	425

Получение биспецифического антитела в формате Fab-scFv на основе антитела к интерферону бета-1 человека и антитела к HER2-рецептору	
А. А. Панина, В. А. Топорова, В. С. Рыбченко, Д. С. Балабашин, В. В. Аргентова, С. А. Якимов, О. Н. Солопова, Т. К. Алиев, Д. А. Долгих, П. Г. Свешников, М. П. Кирпичников	435
Синтез новых би-гетероциклов как ценных антидиабетических агентов: 2-({5-((2-амино-1,3-тиазол-4-ил)метил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил} сульфанил)- N-(замещенный) ацетамиды	
Muhammad Athar Abbasi, Muhammad Shahid Ramzan, Aziz-ur-Rehman, Sabahat Zahra Siddiqui, Syed Adnan Ali Shah, Muhammad Arif Lodhi, Farman Ali Khan, and Bushra Mirza	447
3-Арил(гетерил)-5-фенилиндено[1,2- <i>d</i>]тиазоло[3,2- <i>a</i>]пиримидин-6(5 <i>H</i>)-оны: синтез, характеристика и противомикробная активность	
G. Rajitha, C. G. Arva, B. Janardhan, S. V. Laxmi, G. Ramesh, and U. Sujana Kumari	448



ИНЖЕНЕРИЯ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ: РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН, СИНТЕЗ И СИНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ¹

© 2020 Ya'u Sabo Ajingi^{*, **}, Nujarin Jongruja^{*, #}

* Department of Microbiology, Faculty of Science, King Mongkut's University of Science and Technology Thonburi (KMUTT), Bangkok, Thailand

** Department of Biology, Faculty of Science, Kano University of Science and Technology (KUST), Wudil, Nigeria

Поступила в редакцию 20.07.2019 г. После доработки 16.09.2019 г. Принята к публикации 25.10.2019 г.

Быстрая кинетика клеточного лизиса под воздействием противомикробных пептидов широкого спектра действия привлекает внимание исследователей к ним как к возможным антитоксинам для коммерческого внедрения. К сожалению, — и вопреки значительному потенциалу этих соединений и массированным исследованиям, направленным на продвижение этих соединений для применения в здравоохранении. — на сеголня достижения весьма скулны. В основном, это является слелствием низкой селективности действия противомикробных пептидов по отношению к патогенам, их высокая токсичность по отношению к клеткам человека, чувствительность к действию протеаз, устойчивость микроорганизмов к действию пептидов, высокая стоимость производства, низкая химическая и физическая стабильность, зависимость активности от рН и концентрации солей, а также проблемы, связанные с фармакокинетикой и фармакодинамикой препаратов на основе противомикробных пептидов. Инженерия белков путем рационального дизайна и расчетных подходов, таких как молекулярный докинг и молекулярная динамика, например, для исследования возможностей аминокислотных замен или химического синтеза, а также синергетические эффекты, доказали свою ценность в деле увеличения терапевтического индекса и антибактериальной активности синтетических пептидов. В обзоре мы анализируем литературу с целью выделить вклад современных подходов пептидной инженерии и экспериментальных методов в разработку лекарственных препаратов на основе противомикробных пептидов. Особое внимание уделено рациональному дизайну, пептидной инженерии, пептидному синтезу, производству рекомбинантных пептидов и синергетическим эффектам, а также влиянию используемых методов на пептиды и белки. Также обзор дает исчерпывающее представление о ряде работ, в которых успешно преодолены ограничения, ассоциируемые с применением противомикробных пептидов, и которые могут быть использованы в лальнейшем.

Ключевые слова: противомикробная активность, синтез, инженерия, дизайн, производство рекомбинантных пептидов и белков, синергия DOI: 10.31857/S0132342320040077

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

[#] Автор для связи: (эл. почта: nujarin.jon@kmutt.ac.th).

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 4, с. 340–359



— ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ —

УДК 577.352,615.074

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН С НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ЛЕКАРСТВАМИ

© 2020 г. И. М. Ле-Дейген*, #, А. А. Скуредина*, Е. В. Кудряшова*

 *ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3 Поступила в редакцию 08.02.2020 г. После доработки 20.02.2020 г. Принята к публикации 22.02.2020 г.

Обзор посвящен методам исследования механизма взаимодействия липидных мембран с низкомолекулярными лекарствами. Представлены методы, позволяющие выяснить влияние включения активной молекулы на состояние липидного бислоя: ИК- и ЭПР-спектроскопия, флуоресцентный анализ, дифференциальная сканирующая калориметрия, методы микроскопии. Рассмотрены методы определения размера и заряда везикул: динамическое светорассеяние и анализ траектории наночастиц. Методы разделены на требующие введения дополнительных меток и не требующие таковых. Важной задачей обзора, помимо анализа последних достижений инструментальных методов анализа, является поиск оптимальной стратегии исследования путем подбора информативных, современных подходов к изучению взаимодействия лекарств с липидными мембранами.

Ключевые слова: липосомы, ИК-спектроскопия, ЭПР-спектроскопия, флуоресцентные методы, дифференциальная сканирующая калориметрия

DOI: 10.31857/S013234232004017X

введение

Разработка новых биологически активных веществ и их лекарственных форм ставит перед современной наукой существенные вопросы, связанные с безопасностью и эффективностью терапии. Включение активных молекул в липидные системы доставки позволяет бороться с выраженными побочными эффектами лекарств, повышает биодоступность и биосовместимость препаратов. Таким образом, выявление механизма взаимодействия лекарство — мембрана и влияния активной молекулы на физико-химические свойства бислоя является одними из ключевых задач при создании новых лекарственных форм.

Обширен арсенал физико-химических методов, используемых в данных целях. Однако лавинообразно увеличивающееся количество публикаций по данному вопросу обусловливает потребность в глубоком анализе накопленных данных для обнаружения новых комплексных подходов к изучению взаимодействия липидных мембран с низкомолекулярными лекарствами.

Данный обзор посвящен анализу последних достижений инструментальных методов исследования липидных систем. Отдельно рассматриваются методы, требующие и не требующие введения дополнительных меток. Среди методов, не требующих введения дополнительной метки, рассмотрены как классические подходы, такие как дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), атомно-силовая микроскопия (АСМ), сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), криоэлектронная микроскопия, так и относительно новые, например, метод малоуглового рассеяния рентгеновского излучения, ИК-спектроскопия Фурье, ЭСЭМ-микроскопия (Environmental Scanning Electron Microscopy), метод дифракции излучения лазера на свободных электронах.

Сокращения: 16-ДСК – 16-доксил-стеариновая кислота; 5-ДСК – 5-доксил-стеариновая кислота; АСМ – атомносиловая микроскопия; ДПФХ – дипальмитоилфосфатидилхолин; ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия; ДСР – метод динамического светорассеяния; КЛ – кардиолипин; МС – массовое соотношение; ММРР – метод малоуглового рентгеновского рассеяния; НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение; НТА – метод анализа траектории наночастиц; РВФА – разрешено-временная флуоресцентная анизотропия; СТВ – сверхтонкое взаимодействие; СТР – сверхтонкое расшепление; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; ФКС – флуоресцентная корреляционная спектроскопия; ЭВ – эффективность включения; ЭСЭМ – сканирующая электронная микроскопия в среде.

[#] Автор для связи: (эл. почта: i.m.deygen@gmail.com).



Рис. 1. Схематическое представление (*a*) флуктуаций интенсивности светорассеяния, регистрируемых в малом объеме в микросекундном временном интервале и соответствующей автокорреляционной функции $G(\tau)$ (*б*).

В ряду методов, требующих введения дополнительной метки, рассмотрены флуоресцентные методы анализа, в том числе методы анализа поляризации флуоресценции, разрешено-временная флуоресцентная анизотропия (РВФА), флуоресцентная корреляционная спектроскопия (ФКС), ЭПР-спектроскопия.

Использование нескольких из вышеуказанных методов позволяет оценить расположение и состояние лекарства в липосоме, определить сайты связывания, влияние активной молекулы на фазовый переход и на морфологию везикул.

Отдельно рассмотрены методы "контроля качества" получаемых липидных везикул, оценки эффективности включения активной молекулы, определения размера и заряда везикул: динамическое светорассеяние (ДСР) и анализ траектории наночастиц (НТА), хроматографические методы анализа, УФ-спектроскопия и флуоресцентная спектроскопия. При рассмотрении данного аспекта необходимо принимать во внимание факт существенного влияния способа получения везикул на их физико-химические свойства.

Важной задачей обзора, помимо анализа последних достижений инструментальных методов анализа, является поиск оптимальной стратегии исследования путем подбора информативных, современных подходов к изучению взаимодействия лекарств с липидными мембранами.

1. МЕТОДЫ "КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА" ВЕЗИКУЛ, ЗАГРУЖЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫМ ПРЕПАРАТОМ

Получение липидных везикул, загруженных лекарственным препаратом, — хорошо отработанная процедура [1]. Необходимы методы контроля получаемых липосомальных формуляций; обычно следует подтвердить гомогенность везикул, определить их гидродинамический радиус и дзета-потенциал, а также оценить эффективность включения лекарственного препарата. Рассмотренные в данном разделе методы обычно предваряют анализ полученных липосомальных систем иными методами для установления механизма взаимодействия лекарство — мембрана.

1.1. Методы определения размера, заряда и гомогенности везикул

1.1.1. Динамическое светорассеяние

Классическим методом определения размера липосом является метод динамического светорассеяния [2]. Данный метод позволяет получить данные о распределении по размерам нано- и субмикронных частиц в разбавленных растворах. Луч лазера, проходя через раствор и достигая частицы, отражается и рассеивается, т.к. ее размер сравним с длиной волны. Непрерывное броуновское движение частиц приводит к постоянному перемещению источника рассеивания. Флуктуация локальной концентрации частиц соответствует флуктуации интенсивности рассеянного света [3]. На основе данных временных флуктуаций интенсивности рассеянного света (рис. 1а) строится автокорреляционная кривая $G(\tau)$ (рис. 16), которая описывается уравнением (1):

$$G(\tau) = b \left[1 + \varepsilon \exp\left(-\tau/\tau_{\rm c}\right) \right], \qquad (1)$$

где базовый ("случайный") уровень корреляции *b* пропорционален полной интенсивности I.

Коэффициент диффузии *D* частиц обратно пропорционален времени затухания τ_c рассматриваемой корреляционной функции:

$$D = \frac{1}{2\tau_c k^2},\tag{2}$$

где *k* — константа (модуль волнового вектора рассеяния).

Расчет гидродинамического радиуса наночастиц осуществляется по уравнению Стокса–Эйнштейна через коэффициент диффузии (3),

$$D = \frac{k_{\rm B}T}{6\pi\eta r},\tag{3}$$

где D — коэффициент диффузии, $k_{\rm B}$ — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура, η — вяз-кость жидкости, r — радиус частицы.

Метод вошел в рутинный арсенал исследователей липосомальных систем [4], и без представления данных о гидродинамическом радиусе и коэффициенте полидисперсности (PdI) трудно себе представить достоверное исследование по взаимодействию мембран с лекарствами [5].

ДСР позволяет изучать суспензии частиц с размером от нескольких нанометров до микрона. У метода, однако, есть ряд существенных ограничений. Во-первых, наличие в суспензии крупных частиц микронного размера (пылинки, агрегаты) может исказить результаты определения. Для реальных систем предельная точность измерения позволяет определить обычно лишь средний размер частиц, ширину и асимметрию распределения частиц по размерам. "Разрешить" пики, соответствующие двум популяциям везикул различных размеров, удается, если диаметры различаются в 2-3 раза. Например, с помощью ДСР удалось доказать образование популяции малых везикул с диаметром около 100 нм при инкубации гигантских моноламеллярных липосом (диаметр около 2000 нм) с АТФ и ГТФ в течение 15 минут [6]. Если же в системе присутствуют популяции, например, липосом, покрытых полимерной оболочкой, и непокрытых, чаще всего двух независимых пиков зарегистрировать не удается, однако наблюдается смещение основного максимума в сторону больших размеров [7]. Так, для анионных липосом 60 \pm 2 нм покрытие поликатионом ПЭГ-хитозаном приводило к увеличению гидродинамического радиуса до 85 ± 4 нм. Если же стоит задача разделить две популяции везикул с близкими размерами, можно предложить использовать метод анализа траектории наночастиц.

1.1.2. Анализ траектории наночастиц

Данный подход часто используется для определения концентрации наночастиц в растворе и их распределения по размерам. Раствор облучают лазером, при этом частицы размером менее длины волны ведут себя как точечные рассеиватели света. Наблюдение производится через ультрамикроскоп, расположенный сверху, под прямым углом к лазеру. Высокочувствительная камера записывает видео броуновского движения частиц. Далее компьютер, исходя из известного объема области наблюдения и количества зарегистрированных частиц, рассчитывает концентрацию частиц в растворе (рис. 2) [8]. Например, по данным метода НТА в суспензии анионных липосом, состоящих из 80% массовых дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) и 20% кардиолипина (КЛ), при общей концентрации липидов 3 мг/мл содержится 1×10^{16} везикул/литр [9], что согласуется с теоретическими расчетами. Это позволило определить число полимерных молекул, приходящее-



Рис. 2. Схема строения прибора для анализа траектории частиц.

ся на каждую липосомальную частицу в составе комплекса липосом с ПЭГ-хитозаном.

Как и в методе динамического светорассеяния, гидродинамический радиус наночастицы вычисляется по уравнению Стокса-Эйнштейна. К достоинствам НТА следует отнести возможность различать популяции везикул с небольшим различием в размерах (20-30%), возможность работать с очень низкими концентрациями образца (обычно $10^6 - 10^9$ частиш/мл). возможность исключить фактор крупных пылинок или агрегатов. С другой стороны, пробоподготовка в методе НТА требует использования высокочистой воды (обычно используется система Milli-Q, в которой вода проходит через ионообменные смолы и картриджи с активированным углем, а затем через фильтры с размером пор 0.22 микрона, так, чтобы значение удельного сопротивления составляло 18.2 МОм см). Однако, работа при больших разбавлениях (в случае суспензии липосом 3 мг/мл необходимо разбавлять образец минимум в 10000 раз) может приводить к диссоциации нековалентных липосомальных комплексов, которые, как правило, имеют константы диссоциации порядка 10⁻⁴ М.

Сравнение методов ДСР и НТА приведено в работе [10]. Рассматривалась суспензия катионных липосом состава: яичный фосфатидилхолин : 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин: 1,2-диолеил-3-триметил аммонийпропан в мольном соотношении 4 : 2 : 1. По данным ДСР средний гидродинамический диаметр составил 117 нм с индексом полидисперсности 0.248, что указывает на гетерогенность популяции везикул. Однако, по данным НТА липосомы оказались крупнее (154 нм) и гомогеннее.

Несовпадение результатов определения размеров липосом по данным ДСР и НТА часто встречается на практике [11], что связано с принципи-



Рис. 3. Строение двойного электрического слоя: потенциал в плоскости скольжения соответствует электрокинетическому ζ -потенциалу везикулы. На рисунке ϕ_0 – потенциал стенки, ϕ_d – Штерновский потенциал.

альной разницей в физических основах методов. При этом однозначно отклонить или рекомендовать тот или иной метод для решения рутинных задач не представляется возможным, поскольку у обоих подходов есть ряд ограничений. В случае ДСР обычно учитывают гидродинамический радиус, причем для получения дополнительной информации рассматривают распределение по размерам, взвешенное по интенсивности и по числу частиц, что позволяет выявить влияние крупных агрегатов. Для метода НТА наиболее информативен комплексный анализ траектории движения каждой частицы по видеозаписи, включающий анализ полной длины траектории везикулы (finite track length adjustment FTLA) для наиболее корректного отбора траекторий в расчет гидродинамического радиуса.

Наилучшим решением может быть комбинация обоих методов, как, например в работе [12]. Дополнительные сведения о размере липосом можно получать с помощью методов электронной микроскопии, о которых речь пойдет в следующих разделах обзора.

1.1.3 Определение ζ-потенциала липосом

Часто приборы ДСР оснащены возможностью измерения ζ-потенциала везикул (иногда его называют электрокинетическим потенциалом). Это понятие вводится при рассмотрении двойного электрического слоя движущейся коллоидной частицы (рис. 3) и его удобно использовать как для оценки заряда липосом, так и предположений об их стабильности. Известно, что заряженные везикулы медленнее агрегируют, также их поверхность легче функционализировать полимерами для использования в системах адресной доставки [7, 13, 14]. Следует отметить, что ζ-потенциал очень чувствителен к изменениям условий: на его величину влияет pH, ионная сила, температура и т.д.

Измерение ζ -потенциала проводится в специальной кювете, оснащенной двумя электродами. Наложение электрического поля приводит в движение заряженные везикулы со скоростью, пропорциональной ζ -потенциалу. Скорость (электрофоретическая подвижность U_e) же определяют по рассеянию света. Расчет ζ -потенциала производят по уравнению Генри (4):

$$U_{\rm e} = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta},\tag{4}$$

где ε — диэлектрическая проницаемость, η — вязкость среды, $f(\kappa a)$ — функция Генри, κ — дебаевская длина частицы, a — дебаевский радиус частицы. В аппроксимации Смолуховского для водных сред функцию Генри принимают равной 1.5, а в неводных средах — 1.

В работе [15] проведен сравнительный анализ С-потенциала для липосом различного липидного состава и заряда. Варьируя содержание анионного или катионного липида в нейтральной матрице, авторы обнаружили линейную зависимость ζ-потенциала от мольного содержания заряженного липида. В работах [9, 16] продемонстрирована плавная нейтрализация С-потенциала анионных липосом с выходом на насыщение при добавлении поликатионов - производных хитозана. Встраивание же лекарственных молекул в бислой или включение во внутреннюю полость липосом редко может значительно повлиять на суммарный заряд везикулы: в литературе описаны небольшие изменения, чаще всего в пределах доверительного интервала [17, 18].

Следует отметить, что помимо ζ-потенциала для оценки поверхностного заряда частиц часто используют близкий параметр — электрофоретическую подвижность [14]. Данную величину измеряют методом лазерного микроэлектрофореза. Например, при исследовании взаимодействия поликатионов с липосомами на основе яичного лецитина и кардиолипина с исходным отрицательным значением электрофоретической подвижности сорбция полимера приводила к полной нейтрализации заряда, а дальнейшая сорцбия приводила к перезарядке поверхности везикулы.

Рассмотренная выше группа методов определения размера, заряда и гомогенности везикул служит, таким образом, не только для контроля качества получаемых везикул, но также предоставляет ценную информацию о популяциях частиц. Изменение размера частиц или их заряда



Рис. 4. Методы определения эффективности включения лекарства в липосомы.

при включении лекарственного препарата может предоставить доказательства в пользу того или иного механизма взаимодействия активной молекулы с бислоем.

1.2. Методы определения эффективности включения лекарственного препарата

Ключевой характеристикой липосом как систем доставки лекарственных средств является эффективность включения (ЭВ) активной молекулы. Различают два параметра: собственно ЭВ, рассчитываемую как отношение массы (или моль) включившегося лекарства к общей добавленной массе (или моль) к липидной суспензии, и массовое соотношение (МС) лекарство : липилы в полученной липосомальной форме. Оба параметра важны для характеристики системы доставки: ЭВ подходит для сравнения разных методик загрузки одного и того же лекарства, в то время как МС важнее при сравнении липосомальных систем лоставки с другими носителями в вопросе оптимизации соотношения лекарственного вещества к общей массе системы доставки. Таким образом, оба эти параметра зачастую необходимо рассчитывать. Обычно известно изначально добавленное количество лекарственного препарата, таким образом, необходимо либо определять содержание лекарства в самих липосомах, либо определять содержание невключившегося препарата. Общая схема определения представлена на рис. 4.

Более распространены методики определения количества невключившегося лекарства. Для отделения липосомальной фракции от фракции со свободным лекарством обычно используют диализ или гель-проникающую хроматографию. Достоинства и недостатки данных методов отражены в табл. 1. Оба метода заслуженно активно применяются в исследовательской практике.

Определяют содержание лекарства в промывных водах (в случае диализа) или во фракциях, свободных от липосом. Выбор метода в основном обусловлен природой активной молекулы: зачастую походит УФ-спектроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография, часто – флуоресцентные методы. Для некоторых лекарственных препаратов, например, рапамицина, высокоэффективная жидкостная хроматография является практически единственным возможным решением из-за отсутствия аналитически значимых спектров УФ и флуоресценции [19]. Использование ИК-спектроскопии допустимо, если содержание активной молекулы в изучаемой фракции не менее 0.2-0.5 мг/мл в виду предела обнаружения метода.

При разрушении липосом детергентом для определения содержания лекарства используют те же методы с поправкой на возможное изменение сигнала от активной молекулы. Например, при разрушении липосом, загруженных доксорубицином, поверхностно-активным веществом Tri-

Метод	Достоинства	Недостатки
Диализ	Методическая простота Доступность (подходят диализные мешки с большой массой отсечения)	Необходим контроль сохранности липосом Сильное разбавление фракции свободного лекарства Длительность: от нескольких часов до суток
Гель-проникающая хроматография	Методическая простота Быстрота Возможна работа с малыми объемами (менее 1 мл)	Необходим подбор носителя для колонки Возможное разбавление липосомальной фракции

Таблица 1. Методы разделения липосомальной фракции и фракции невключившегося лекарства

ton-X необходимо определять содержание лекарства по калибровочным кривым, полученным для лекарства в присутствии соответствующего содержания детергента, поскольку потенциальное мицеллообразование [20] может значительно изменить коэффициент молярного поглощения препарата и исказить определение ЭВ.

Направление, связанное с определением ЭВ в липосомах без предварительного разрушения, разработано гораздо слабее по сравнению с остальными. Это обусловлено рядом причин: во-первых, липосомальные системы часто оптически непрозрачны, что затрудняет применение многих спектральных методов. Во-вторых, присутствие липидов как таковых и их коллоидных везикул существенно может искажать сигнал от активной молекулы.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ И ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

2.1. Методы исследования липидных систем, не требующие введения дополнительных меток

Рассматриваемые выше методы служат в первую очередь для контроля качества получаемых липосомальных форм активных молекул, но не предоставляют информации о механизме взаимодействия лекарство — бислой. Далее представлены методы, которые могут быть полезны для изучения основных закономерностей данного процесса. Важным их достоинством является отсутствие необходимости вводить дополнительные метки в бислой, что упрощает интерпретацию данных и ускоряет анализ.

2.1.1. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Рассмотрим подробнее метод дифференциальной сканирующей калориметрии, который изначально нашел свое широкое применение в изучении фазовых переходов в липосомах. В работе [21] приведен исчерпывающий обзор, представляющий собой описание возможностей ДСК для анализа структуры и свойств липосом, однако метод хорошо подходит и для установления особенностей взаимодействия низко- и высокомолекулярных веществ с бислоем на основе различий в калориметрических кривых.

В работе [22] методом ДСК установили, что при взаимодействии липосомальной мембраны (100% дистеароилфосфатидилхолин) с тамоксифеном фазовый переход смещается в область меньших температур, при этом максимум на кривой ДСК уширяется, что указывает на дестабилизацию мембраны, по-видимому, за счет встраивания лекарства в бислой.

Более точная регистрация кривых ДСК позволяет получать информацию о состоянии лекарства в липосомах и определении локализации лекарства. Фоггиа с коллегами изучали взаимодействие нестероидного противовоспалительного препарата ибупрофена с липосомами из димистроилфосфатидилхолина [23]. Регистрация кривых ДСК при различных значениях рН позволила установить, что протонированная форма ибупрофена при рН 3 способна проникать в неполярную часть бислоя, в то время как при рН 7 взаимодействие депротонированного ибупрофена с холиновым группами фосфолипида препятствует дальнейшему проникновению препарата.

Иехезкель Баренхольц [24] с коллегами при разработке нового липофильного пролекарства митомицина С и изучении его влияния на мембрану ПЭГилированных липосом обнаружили, что наличие двух остатков стеариновой кислоты в структуре пролекарства обеспечивают стабильное встраивание в липосомный бислой, о чем свидетельствует изменение максимума на кривой ДСК: пик становится высокоинтенсивным и узким с максимумом при 56°С и плечом при 53°С, причем для контрольных липосом пик был широким с максимумом при 53°С. Авторы отмечают, что такой тип фазового перехода характерен для мембраны, содержащей холестерин, и объясняют наблюдаемое явление формированием богатых пролекарством доменов в мембранах, в которых гидрофобные цепи плотно упакованы в высокоупорядоченные кристаллоподобные структуры.

Внимание исследователей привлекает изучение нанокристаллов активных молекул, которые образуются при включении в липосомы [25]. Ли с коллегами в работе фокусировались на методах получения подобных нанокристаллических систем в липосомах, упоминая ДСК как возможный метод обнаружения кристаллов в везикулах. Ранее уже было показана кристалличность сульфата доксорубицина и некоторых других препаратов с помощью калориметрии высокого разрешения, однако о их природе и свойствах ведутся споры. В работе 2012 года [26] не обнаруживали существенного влияния на фазовый переход дипильмитоилфосфатидилхолиновых липосом встраивания доксорубицина. Однако в 2017 году усовершенствованная техника позволила Перинелли с коллегами обнаружить упорядоченное состояние нанокристаллов доксорубицина внутри ПЭГилированных липосом (формуляция Доксила), причем кристаллы оставались стабильны даже после нагревания до 80°С [27].

Применение ДСК позволяет следить за микрофазовым разделением в мембране липосом смешанного состава. Так, для смешанных анионных липосом ДПФХ/КЛ (80/20%) комбинацией методов ДСК и ИК-спектроскопии обнаружено расслоение в липидном бислое с образованием двух доменов с различными температурами плавления [18]. Калориметрическая кривая смешанных липосом характеризовалась широким фазовым переходом с пиком при 39° С и плечом при 35° С, которые отвечали плавлению двух микрофаз ДПФХ/КЛ с различным соотношением компонентов. Для таких липосом загруженных моксифлоксацином, удалось доказать структурирование и стабилизацию гелеобразной фазы за счет электростатического взаимодействия аминогруппы активной молекулы с отрицательно заряженным кардиолипином. Температура основного фазового перехода липосом, загруженных моксифлоксацином сдвинулась на 3-5 градусов.

Таким образом, метод ДСК позволяет изучать детали процесса фазового перехода в липосомах и влияния на него лекарств, косвенно обнаружить образование нанокристаллов или интеграцию активной молекулы в бислой.

В качестве альтернативы ДСК в работе [28] предложено использовать метод ДСР, причем аналитическим сигналом будет служить величина average count rate (средняя скорость счета). Включение в димистроилфосфатидилхолиновые липосомы препарата целекоксиба приводило к достоверному смещению кривой средняя скорость роста – температура в область больших температур. Сравнение кривых для загруженных и свободных липосом при рН 5.0 и 7.4 выявило, что при обоих значениях рН кривые смещаются единообразно, но в нейтральной среде эффект более выражен (расчетные температуры плавления составили 21.7 и 20.7°С против контрольного значения для свободных липосом 22.0°С). Авторы предполагают, что в кислой среде встраивание целексосиба влияет на кооперативность фазового перехода, а не на значение температуры фазового перехода, в то время как при рН 7.4 целекоксиб разупорядочивает мембрану, что проявляется в потере кооперативности и уменьшении температуры фазового перехода.

2.1.2. Метод малоуглового рассеяния рентгеновского излучения

В методе малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (ММРР) измеряют интенсивность рентгеновских лучей, рассеянных от образца в зависимости от угла рассеяния ($0.1^{\circ}-5^{\circ}$ С). Ключевым преимуществом данного метода относительно классических рентгеновских методов является его универсальность для многих типов наноматериалов и способность регистрировать спектры от образцов, как в порошковой, так и в гелеообразной и жидкой дисперсной форме. Установки ММРР позволяют исследовать усредненные структурные особенности от образца большого объема, что может быть полезно при работе с неоднородными коллоидными системами. Данный метод хорошо подходит для изучения взаимодействия мембран с активными молекулами, кристаллизующимися во внутренней полости везикул.

Важным достоинством ММРР является возможность определять форму везикул. Известно, что методы динамического светорассеяния и анализа траектории наночастиц предоставляют информацию о гидродинамическом радиусе частиц из предположения об их сферической форме, в то время как липосомы, содержащие нанокристаллы вытянутой формы, могут принимать и эллиптическую форму. Аналитически ценным параметром из спектра ММРР является вектор рассеяния q; обработка зависимости интенсивности рассеяния от q методом Фурье-преобразований позволяет построить график функции распределения парных расстояний.

Значительных успехов в изучении липосомальных форм нанокристаллов антибиотиков достигли Чиполла и Чен, Университет Сиднея. Их работы посвящены в первую очередь изучению нанокристаллов ципрофлоксацина — антибиотика широкого спектра действия фторхинолонового ряда [25, 29, 30]. Например, комбинацией методов ММРР, криоэлектронной микроскопии и деполяризованного динамического светорассеяния авторам удалось доказать [30] циллиндрическую форму липосом, загруженных ципрофлоксацином.

К недостаткам метода ММРР можно отнести слабый сигнал, накапливаемый от липосомальных суспензий, возможное перекрывание спектров везикул и нанокристаллов и потенциальное разрушение образца в процессе исследования.

Рентгеновские методы активно применяют для исследования липосомальных форм неорганических наночастиц — фотосенсибилизаторов, например наночастиц иридия [31], с целью подтвердить неизменность кристалличности неорганической фракции после включения в везикулы. Однако взаимодействие липосом с неорганическими наночастицами представляет собой отдельную тему, достойную объемного обзора, и несколько выходит за рамки обсуждаемой в настоящей работе тематики.

2.1.3. ИК-спектроскопия Фурье

ИК-спектроскопия Фурье заслуженно вошла в арсенал исследователей липидных систем как один из наиболее информативных и точных методов, позволяющий получать уникальную информацию о микроокружении функциональных групп липидов, их взаимодействии с различными лигандами и фазовых переходах. Использование ИК-спектроскопии для анализа биосистем стало возможным с развитием аппаратуры и методов математической обработки (Фурье-преобразования) исходного сигнала прибора – интерферограммы.

Рассмотрим три оптических эффекта, обеспечивающих высокую точность метода ИК-спектроскопии Фурье. Первый из них получил название выигрыш Жакино. Его суть состоит в том, что в схеме Фурье-спектрометра, в отличие от классического дисперсионного, отсутствует щель, так что все излучение достигает детектора. При фиксированной разрешающей силе светосила Фурьеспектрометра в 200 раз превышает светосилы дисперсионного спектрометра.

Следующий эффект получил название выигрыш Фельжета или фактор мультиплексности. Он связан с одновременной регистрацией в спектре всех частот. Например, при одновременной регистрации и обработке спектрального интервала 4000 см⁻¹ при разрешении 1 см⁻¹ соотношение сигнал-шум для Фурье-спектрометра будет в 63 раза выше, а скорость регистрации спектра в 4000 раз выше. В настоящее время регистрация одного спектра в высоком разрешении, пригодного для тонкого анализа спектральных полос, занимает не более двух минут, что, несомненно, является важным методическим достоинством метода.

Третий эффект получил название выигрыш Конна. Использование в ИК-спектрометрах гелий-неоновых лазеров как внутренних стандартов длин волн и для контроля интерферограммы в зависимости от положения подвижного зеркала позволило значительно повысить точность определения волновых чисел. В настоящее время некоторые приборы характеризуются разрешением 0.01 см^{-1} . Подобные машины требуют тонкой наладки перед каждым запуском, в то время как рутинные измерения можно надежно проводить при разрешение $1-2 \text{ см}^{-1}$.

На сегодняшний день в исследовании сложных биологических систем наиболее широко используется режим нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) [32]. Явление НПВО основано на проникновении излучения из оптически более плотной среды (кристалла n_1) в менее плотную среду (образец n_2) на некоторую длину (т.н. penetration depth dp), примерно равную длине волны, при падении света под углом, большим критического, при этом часть падающего излучения проникает в образец на dp и там поглощается. Критический угол определяют как угол падения, при котором угол преломления составляет 90°, его величина зависит от коэффициентов n_1 и n_2 .

Следует отметить, что поскольку *dp* прямо пропорциональна длине волны излучения, в длинноволновой области спектра НПВО следует ожидать большую интенсивность полос поглощения. Если n_2/n_1 постоянно, то *dp* линейно зависит от длины волны. Большинство современных программ для анализа ИК-спектров предлагают функцию ATRcorrection, которая линейно корректирует интенсивности полос, приводя спектр к виду близкому к спектру пропускания.

Пионерские работы по использованию ИКспектроскопии Фурье для анализа белковых и липидных систем принадлежат Эрику Гурматигху и его научной группе в Свободном Университете Брюсселя, Бельгия. В его лаборатории разработаны многочисленные протоколы регистрации спектров с подбором оптимальных условий: типом кристалла, количеством сканирований, способом атмосферной компенсации и т.д. и методы их анализа.

ИК-спектр фосфолипидов имеет следующие характеристические пики функциональных групп: две полосы симметричных и ассиметричных колебаний углеводородных связей, колебания карбонильной группы С=О, колебания фосфатной и холиновой групп (рис. 5). Полное соотнесение полос поглощения и соответствующих колебаний дипальмитоилфосфатидилхолина представлено в табл. 2. Положение полос и их форма чувствительны к связыванию бислоя с лигандами, к образованию водородных связей, агрегации и окислению и т.д. [7, 11, 18, 26, 33–37].

Симметричным и асимметричным валентным колебаниям СН₂ группы соответствуют полосы в регионе 2853 ± 5 и 2926 ± 5 см⁻¹, деформационным колебаниям соответствует полоса при 1465 ± ± 5 см⁻¹ (так называемая частота метиленовой леформации). Симметричные деформационные колебания СН₃ группы характеризуются полосой поглощения при 1375 \pm 5 см⁻¹. Изменение конформации липидных цепей сопровождается частотным сдвигом полос поглощения групп СН₂, причем эти изменения коррелируют с числом иис-изомеров ненасыщенных остатков гидрофобных хвостов. Цис-изомеры упакованы менее плотно по сравнению с транс-изомерами, ацильные цепи могут менять свое направление и размер. Увеличение подвижности сопровождается высокочастотным сдвигом на ИК-спектре [7]. Влияние на фазовый переход различных лекарственных препаратов можно оценивать как по смещению полос поглощения симметричных и асимметричных валентных колебаний СН₂ групп, так и с использованием метода главных компонент (principal component analysis PCA). Классическим подходом является регистрация зависимости положения полос поглощения CH₂ as и СН₂ s в зависимости от температуры. Например, в работе [33] исследовали влияние витамина D₂ в присутствии ионов Mg²⁺: установлено, что фазовый переход существенно замедляется, однако,



Рис. 5. Нормализованный ИК-спектр нарушенного полного внутреннего отражения дипальмитоилфосфатидилхолина.

ход кривых остается единообразным, что указывает на упорядочивающий эффект активной молекулы на бислой, сопровождающийся уменьшением доли числа *транс*-конформеров (рис. 6). В качестве вспомогательного источника информации авторы использовали ширину данной полосы поглощения (на уровне 0.75 высоты пика), которая уменьшалась при введении в липосомы витамина D₂, что подтверждает данные термограммы.

Однако, для мультикомпонентных липосом, склонных к образованию микрофаз, например, содержащих 80% ДПФХ и 20% КЛ, ход термограмм может значительно изменяться в присутствии ак-

тивных молекул. Для контрольных незагруженных везикул ход кривой плавный, S-образный (рис. 7), отдельные микрофазы не различаются. При этом, в работе [18] был обнаружен эффект независимого взаимодействия моксифлоксацина с микрофазами с разным содержанием КЛ, что отражается принципиальным изменением хода кривой термограммы положение CH_2 as – температура, а именно минимумами в диапазоне температур 28-35°С. указывающими на локальное упорядочивание бислоя (рис. 7).

Распространен подход, связанный с математической обработкой спектров по методу главных

Волновое число, см ⁻¹	Колебание	Волновое число, см $^{-1}$	Колебание	
3010	=С-Н (вал.)	1378	СН ₃ (сим. деф.)	
2956	СН ₃ (асим. вал.)	1400-1200	CH ₂ (веерные)	
2920	CH ₂ (асим. вал.)	1228	PO ₂ ⁻ (асим. вал.)	
2870	СН ₃ (сим. вал.)	1170	СО-О-С (асим. вал.)	
2850	CH ₂ (сим. вал.)	1085	PO ₂ ⁻ (сим. вал.)	
1730	С=О (вал.)	1070	СО-О-С (сим. вал.)	
1485	(CH ₃) ₃ N ⁺ (асим. деф.)	1047	С-О-Р (вал.)	
1473, 1472, 1468, 1463	CH ₂ (ножн.)	972	(CH ₃) ₃ N ⁺ (асим. вал.)	
1460	СН ₃ (асим. деф.)	820	Р-О (асим. вал.)	
1405	(CH ₃) ₃ N ⁺ (сим. деф.)	730, 720, 718	СН ₂ (маят.)	

Таблина ? Характерные полосы в ИК-спектре лицилов по данным. Ланы в сокращении названия колебаний:



Рис. 6. Зависимость положения полосы поглощения валентных колебаний CH_2 в липосомах ДПФХ в присутствии витамина D_2 и ионов Mg^{2+} .

компонент, который также может предоставить дополнительную информацию о фазовом переходе липосомальных форм активных молекул, особенно в случае накопления большого объема данных. В работе [38] рассматривалось взаимодействие флуфеназина с липосомами из яичного сфингомиелина. Тонкий анализ спектральных изменений позволил авторам сделать вывод о том, что включение лекарства в бислой приводит к снижению температуры фазового перехода пропорционально содержанию активной молекулы, что в свою очередь приводит к быстрому высвобождению флуфеназина в водную фазу.

Метод ИК-спектроскопии чувствителен к изменениям в плотности упаковки ацильных цепей и в случае внешнего воздействия на мембрану, например, под действием колебательно-вращательного движения наностержней магнетита в низкочастнотном негреющем переменном магнитном поле [11]. В данном случае метод деконволюции, то есть разложения наблюдаемой полосы поглощения на несколько компонент, позволил количественно оценить эффект разрыхления бислоя.

Полосы поглощения карбонильной и фосфатной группы в первую очередь чувствительны к изменению степени гидратации данных функциональных групп, в том числе за счет образования ионных связей и агрегации.

Гидратированная карбонильная С=О группа в липидах и липосомах поглощает в регионе 1730 см⁻¹. На кислороде находится частично отрицательный заряд, который в свободных липосомах компенсируется за счет образования водородных связей с молекулами воды. При снижении степени гидратации, то есть разрыве части водородных связей, характеристическое волновое число возрастает. Так происходит, например, при взаимодействии липосом с поликатионами или рядом биологически-активных полярных веществ [7, 34]. Изменения в области поглощения карбонильной группы чрезвычайно информативны при анализе изменений на границе раздела фаз липид-вода, в том числе для контроля за сохранностью липосом при хранении [7].

Для фосфатной группы определены две основных полосы поглощения, соответствующих симметричным 1088 см⁻¹ и асимметричным 1250– 1230 см⁻¹ валентным колебаниям. Наибольший интерес представляет полоса асимметричных ко-



Рис. 7. Зависимость положения полосы поглощения валентных колебаний CH₂ в липосомах ДПФХ 80%, кардиолипин 20% (пунктир) и липосомах того же состава, загруженных моксифлоксацином.

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 4 2020

ЛЕ-ДЕЙГЕН и др.

Полоса поглощения	Получаемая информация	Возможные методы анализа спектров	Ссылки
CH ₂ as, CH ₂ s	Влияние активной молекулы на плотность упаковки липидов	Анализ положения полос поглощения (смещения в область больших волновых чисел указывают на разрыхление, в область меньших — на упорядочивание)	[11, 33]
	Влияние активной моле- кулы на фазовый переход	Анализ термограмм CH_2 as (<i>T</i>), CH_2 s (<i>T</i>), метод главных компонент	[11, 18, 33]
СО	Влияние активной молекулы на поверхность раздела фаз, образование водородных связей	Анализ положения полосы поглощения (смещения в область больших волновых чисел указывают на увеличение степени гидратации, в область мень- ших — на образование электростатических связей)	[7]
	с катионными лигандами	Деконволюция полосы поглощения для количе- ственной оценки изменения степени гидратации карбонильной группы	[7, 34, 36, 37]
PO ₂ as	Влияние активной молекулы на гидрофиль- ную поверхность липосом	Анализ положения полосы поглощения (смещения в область больших волновых чисел указывают на образование электростатических связей)	[26, 35]
		Деконволюция полосы поглощения для количе- ственной оценки изменения степени гидратации фосфатной группы	[34]

Таблица 3. Информация от основных полос поглощения в ИК-спектре липосом

лебаний, как более чувствительная к степени гидратации. Низкочастотный сдвиг положения данной полосы поглощения связан с повышением степени гидратации [34], и наоборот. Вид и форма данной полосы существенным образом может измениться при добавлении активной молекулы, как показано в работе [35] на примере липосом с включенными в них нестероидными противовоспалительными средствами.

Помимо анализа смещения полос поглощения карбонильной и фосфатной групп исключительно полезной может быть процедура деконволюции, поскольку становится возможным выявить компоненты, соответствующие функциональным группам, связанным с активной молекулой. Например, при встраивании в анионные липосомы доксорубицина, модифицированного фрагментом спермина и стеариновой кислоты, происходит двукратное уменьшение доли высокогидратированных фосфатных групп, которым соответствует компонента 1219 см⁻¹, и двукратное увеличение доли низкогидратированных карбонильных групп (компонента 1745 см⁻¹) [34].

Таким образом, метод ИК-спектроскопии информативен при изучении многих параметров липосомальных систем: процесса фазового перехода, электростатического взаимодействия с лекарствами, изменениям микроокружения на поверхности раздела фаз липид-вода за счет связывания с лигандами или при агрегации. В табл. 3 приведены основные способы обработки полос поглощения липосом и информация, которую можно получить.

2.1.4. Методы на чипе

Методы на чипе [39] лишь набирают популярность для изучения взаимодействия поверхности липосом с лекарством. Для этого хорошо подходит метод гигантского плазмонного резонанса. Авторы предложили сначала на модифицированную алканами декстрановую матрицу на чипе сорбировать липосомы с разным содержанием холестерина, а далее во внешний раствор вводить лекарственный препарат. Метод предполагает использование отклика системы на связывание на чипе лекарства с липосомальной мембраной. При этом важную роль играет кинетика сорбции, по которой можно сделать выводы о силе взаимодействия лекарства с мембраной. Так, удалось установить, что анионные лекарства быстро диссоциируют с поверхности липосом, в то время как катионные лекарства в зависимости от своей природы более прочно связываются с бислоем.

2.1.5. Методы микроскопии

Как известно, размер моноламеллярных липосом (30—150 нм) значительно меньше дифракционного предела, поэтому для изучения взаимодействия везикул с лекарственными молекулами могут быть применены методы электронной микроскопии и атомной силовой микроскопии [40].



Липосома с нанокристаллом доксорубицина

Рис. 8. Криоэлектронная микроскопия для (слева-направо) контрольных незагруженных липосом, содержащих 20% мольных доксорубицина, 40% мольных доксорубицина.

Специфика данных методов позволяет исследовать топологию поверхности везикул. Обширный обзор по методам визуализации липосом представлен в работе [41], в настоящем обзоре хотелось бы выделить особенности применения методов микроскопии для изучения влияния загрузки лекарственных препаратов на морфологию липосом.

К преимуществам ACM можно отнести возможность работы, как в контактном, так и в бесконтактном режиме, и получение информации о морфологии липосом без дополнительной пробоподготовки (окрашивания, фиксации или введения меток). Однако, движения кантилевера могут вызывать деформацию бислоя [42], а сами везикулы должны быть нанесены на подложку, что может влиять на их морфологию [41].

В работе [43] показана применимость метода ACM для 3D анализа популяции липосом, загруженных доксорубицином: везикулы с наибольшими кристаллами доксорубицина приобретали вытянутую форму; данные подтверждали методом криоэлектронной микроскопии.

Применимость сканирующей электронной микроскопии для липосомальных систем ограничена в виду структурных изменений в условиях глубокого вакуума. Однако именно методы электронной микроскопии позволяют определять не только размеры везикул, но и оценивать их ламеллярность. Негативное контрастирование, например, с помощью $UO_2(CH_3COO)_2$, может быть полезно для оценки. Более того, необходимость высушивания, фиксации и окраски образца также затрудняет получение достоверных результатов. Решение данной проблемы было предложено Данилатосом, автором метода ЭСЭМ (Environmental Scanning Electron Microscopy), в котором допустима работа с образцами в газовой среде, включая воздух.

Заслуженно значимую роль в визуализации и характеризации липосомальных форм лекарственных препаратов играет криоэлектронная микроскопия (рис. 8). Метод позволяет изучать липосомы в их нативном состоянии, без применения дополнительных процедур фиксации или окрашивания. В зависимости от толщины образца можно добиться разрешения до 5 нм [41]. Данный метод позволяет отследить влияние мольного соотношения активной молекулы и липидов на морфологию везикул, так в работе [44] при мольном соотношении 0.05 липосомы ожидаемо напоминают кофейные зерна с нанокристаллом доксорубицина внутри, но при больших мольных соотношениях (0.37) неожиданно обнаруживались даже треугольные структуры, в которых три нанокристалла доксорубицина образуют правильный треугольник в пределах одной липосомы.

В случае, если загруженный препарат не образует кристаллическую форму в липосоме, метод криоэлектронной микроскопии также может быть полезен. Так, в работе [45] по увеличенной электронной плотности внутренней полости липосом по сравнению с изображениями контрольных незагруженных везикул судили о включении винкристина, винбластина и винорелбина во внутреннюю полость липосом.

В лаборатории проф. Баренхольца недавно был предложен подход к реконструкции 3D структуры липосом по 2D криоэлектронным микрофотографиям [46], который позволяет получать дополнительную информацию о распределении препарата в везикулах. Данный подход может быть чрезвычайно полезным при исследовании взаимодействия липосом с, например, липофильно-модифицированными лекарствами, которые могут искажать строение мембраны.

2.1.6. Метод дифракции излучения лазера на свободных электронах

Исключительных результатов удалось добиться при визуализации в растворе липосом, загруженных доксорубицином, методом дифракции излучения лазера на свободных электронах (Freeelectron coherent diffraction imaging) [47]. По дифракционной картине от одиночных загружен-



Рис. 9. Флуоресцентные метки-репортеры для изучения состояния гидрофобной части бислоя. (*a*) Спектр флуоресценции пирена, приведены формулы мономера и эксимера. (*b*) Структура и спектры поглощения (*1*) и флуоресценции (*2*) N-[7-(4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бор-3а,4а-диазо-s-индекан-8)гептил]сфингозин-1-фосфотидилхолина.

ных препаратом липосом авторам удалось реконструировать реальную форму кристалла доксорубицина в водной полости липосом. Данный метод пока ограниченно применяется, поскольку кристаллические формы в липосомах образуют не все активные молекулы, однако может быть чрезвычайно полезными при исследовании встраивания нанокристаллов в везикулы.

2.2. Методы исследования липидных систем, требующие введения дополнительных меток

2.2.1. Методы, основанные на введении флуоресцентных меток

Важную роль в исследовании структуры липосом и их комплексов играет флуоресцентная спектроскопия. Поскольку природные липиды собственных флуорофорофоров в структуре не имеют, необходимо введение в везикулы метокрепортеров, в зависимости от свойств которых можно получать информацию о состоянии гидрофобной или гидрофильной части липосом [48]. Можно сформулировать ряд ключевых свойств флуоресцентых меток, которые следует учитывать при выборе:

 Основные характеристики флуорофоров, а именно длины волн возбуждения и испускания, квантовый выход и флуоресцентное время жизни;

2. Часто для изучения липидных систем предпочтение отдают меткам, флуоресцентные свойства которых резко меняются при изменении полярности среды;

 Желательна простота методики встраивания флуоресцентной метки в липосомы, при этом следует отдельно удостовериться в локализации метки в везикуле. Надежной и удобной меткой-репортером для липосом является пирен, по изменению спектра флуоресценции которого можно судить об изменении подвижности гидрофобных цепей липидов (рис. 9).

Одной из первых работ, в которой предложено использовать пирен для изучения состояния гидрофобной части бислоя, является [49]. Авторы сравнили ряд органических молекул: пирен, нафталин и 1,12-бензперилен — с точки зрения их поведения в бислое, в том числе в процессе фазового перехода. Установлено, что завершение фазового перехода приводит к заглублению пирена в бислой. Аналогичный эффект был обнаружен для 1,12-бензперилена, в то время как нафталин оставался на неизменной позиции.

Известно, что в спектре флуоресценции пирена присутствуют два максимума: 394 нм (мономера) и 475 нм (эксимера-димера, состоящего из возбужденной и невозбужденной молекулы пирена). Дальнейшие исследования [50] показали, что аналитически значимой величиной является отношение интенсивностей данных максимумов. При разрыхлении мембраны вероятность образования эксимера увеличивается, что приводит к пропорциональному увеличению интенсивности соответствующего максимума. В работе [51] показано, например, что связывание липосомальных мембран с некоторыми противоартимическими средствами (этмозин, ксантиверин) сопровождается снижением микровязкости бислоя. Однако в той же работе отмечается и недостаток пирена как метки – зачастую сигналы от мономера или эксимера перекрываются с сигналами от самих лекарств, что делает расчет отношения недостоверным.

Перспективным является использование интенсивно флуоресцирующих меток на основе борфторидных комплексов дипирролилметена BODIPY (рис. 9). Для более эффективного встраивания подобных меток в липосомы часто получают липидоподобные молекулы, в которых присутствует фрагмент BODIPY. Значительных успехов в синтезе подобных молекул достигла лаборатория проф. Е.Л. Водовозовой. Так, была получена липидоподобная метка [52], обладающая высоким $\varepsilon = 90000$ и встраивающаяся в гидрофобную часть бислоя. Применение подобных меток значительно упрощает проведение анализа, например, при изучении белок-мембранных взаимодействий [52], однако следует учесть ряд особенностей такого подхода. Метка предоставляет информацию о своем ближайшем микроокружении, в то время как для комплексов липосом с полиэлектролитами часто наблюдается микрофазовое разделение; сведения в таком случае могут быть сложными для анализа. Более того, для надежного встраивания метки в бислой часть требуется ее липофильная модификация; без этого возможно перемещение метки по бислою в процессе, например, фазового перехода.

2.2.2. Флуоресцентная корреляционная спектроскопия

Метод ФКС основан на том, что диффузия флуоресцентных молекул вызывает флуктуации в интенсивности флуоресценции в малом элементе объема (0.1–0.5 фемталитр), который создается в конфокальном микроскопе (рис. 10). Данный метод позволяет получать информацию о локальной концентрации биомолекул, а также следить за агрегацией, за взаимодействием с лигандами, за трансляционной диффузией и внутренней подвижностью флуоресцентно меченных биополимеров. Измеряемой величиной является интенсивность излучения F(t) от нескольких флуоресцентных объектов в освещенном лазерном объеме. Флуктуация интенсивности обусловлена броуновским движением флуоресцентных объектов в освещенном лазерном объеме. Время, за которое данный объект пересекает освещенный объем связано с коэффициентом диффузии D [53]. Для расчета D, а в дальнейшем и гидродинамического радиуса анализируют автокорреляционную функцию G(t) (5):

$$G(t) = \frac{\langle I \rangle^2 + \langle \delta I(t) \, \delta I(t+\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2}, \tag{5}$$

где I(t) – интенсивность флуоресценции при времени t, $I(t + \tau)$ – интенсивность флуоресценции после промежутка времени τ .

Из анализа автокорреляционной функции G(t) определяют время трансляционной диффузии, τ_d ,

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 4 2020

которое характеризует время пребывания молекулы в рассматриваемом элементе объема (6):

$$G(\tau) = \frac{1}{N(1 + \tau/\tau_d) \left(1 + \left(\tau/a^2 \tau_d\right)\right)^{1/2}}.$$
 (6)

Метод относят к методам детекции одиночных молекул, поскольку он позволяет работать с минимальными концентрациями флуорофора (единичные молекулы в освещенном объеме).

Особенно информативен метод ФКС, если само лекарство является флуорофором. Например, в работе [54] рассмотрено взаимодействие хорошо изученного противогрибкового препарата сангвинарина, для которого недавно обнаружили противоопухолевую активность, с липидным бислоем. Коэффициент диффузии сангвинарина, включенного в липосомы (63.8 \pm 3 мкм² с⁻¹), в 7 раз ниже оного для лекарства в буферном растворе $(9.07 \pm 0.42 \text{ мкм}^2 \text{ c}^{-1})$. Напротив, введение бетациклодекстрина, олигосахарида, способного взаимодействовать с бислоем, приводило к увеличению *D* почти в 5 раз (25.76 ± 1.21 мкм² с⁻¹). Повреждение липосомальной мембраны под действием бета-циклодекстрина приводит к существенно большей подвижности лекарственной молекулы, что отражается на сигнале ФКС.

Если лекарство не является флуорофором, можно ввести соответствующую метку, причем ее концентрация может быть минимальной в виду того, что метод ФКС может быть отнесен к методам детекции единичных молекул. По изменению D судят о вязкости липосом; существенное изменение указывает на размягчение или наоборот затвердевание бислоя.

Большое количество работ в последние годы посвящено методу ФКС для анализа взаимодействия липосомальных лекарственных форм с белками плазмы крови. Например, в работе [55] рассмотрено поведение липосомальной формы флуоресцентно меченого ди-β-D-галактопиранозида в присутствии сывороточного альбумина, трансферрина, аполипопротеи на А1 и фибриногена. Авторы использовали ФКС для отслеживания высвобождения содержимого липосом (для этого во внешний раствор при проведении экспериментов по высвобождению вводили галактозидазу, которая расщепляла связь между флуоресцеином и галактопиранозидом, после чего содержание свободного флуоресцеина определяли по ФКС) и расчета констант лиссоциации комплекса с белками. Для этого необходимо было использовать белки, меченные красителем Алекса 488, которые титруют липосомальной суспензией. Связывание с белками приводит к изменению сигнала ФКС; математическая обработка данных может позволить даже рассчитать константы диссоциации комплексов.



Рис. 10. Принцип метода флуоресцентной корреляционной спектроскопии. (*a*) Сфокусированный лазерный луч освещает фиксированный малый объем измеряемой системы (1 фемтолитр). (δ) Измерение флуктуации интенсивности флуоресценции в объеме детекции (0.1–0.5 фемтолитр) как функция от времени. (*в*) Автокорелляционный анализ интенсивности позволяет определять среднее число частиц в объеме детекциии время и трансляционной диффузии исследуемых флуоресцентных молекул. (*г*) Статистический анализ распределения частиц по молекулярной яркости (число детектируемых флуоресцентных фотонов в пересчете на молекулу в секунду).

2.2.3. Метод разрешенно-временной анизотропии

Метод разрешенно-временной анизотропии – относительно новый микроспектроскопический метод, широко используемый для исследования структуры биомолекул и их комплексов в растворах. Он позволяет следить за вращательной динамикой как комплекса биомолекул, так и каждого из фрагментов, обладающих независимым вращением, и в итоге получать детальную информацию о пространственной структуре липосомальных систем [53, 56, 58].

В РВФА эксперименте определяется величина флуоресцентной анизотропии как функция от времени [57]. Анизотропия сферических молекул, вращение которых симметрично (изотропно), затухает согласно моноэкспоненциальному закону, в общем случае "затухание" анизотропии описывается мультиэкспоненциальной зависимостью (7):

$$r(t) = \sum \beta_j \exp(-t/\varphi_j), \qquad (7)$$

где ϕ_j — индивидуальные корреляционные времена вращения, отражающие скорость вращательного движения флуорофора, а β_j — вклады соответствующих компонентов в затухание анизотропии.

Так как анизотропия r(t) вычисляется по разности между наблюдаемыми компонентами эмиссии флуоресценции $I_{\parallel}(t)$ и $I_{\perp}(t)$, надежные значения анизотропии r(t) могут быть вычислены только для времен, при которых наблюдается значительное испускание флуоресценции. По этой причине обычно в качестве метки выбирают флуорофоры со временем затухания, сравнимым с предполагаемым корреляционным временем вращения. Если флуоресцентное время жизни τ много меньше ϕ , то интенсивность флуоресценции затухает раньше, чем произойдет заметная потеря анизотропии.

В биосистемах существует несколько причин потери анизотропии (или деполяризации): быстрое движение флуоресцентной метки относительно места ее прикрепления, более медленное внутреннее движение сегментов биополимера, медленное вращение всей молекулы биополимера, очень медленное вращение надмолекулярного комплекса, а также, перенос энергии между хромофорами. При взаимодействии липосомальных форм лекарственных средств с белками, например, белками крови, спад анизотропии принимает сложный вид: появляются дополнительные источники деполяризации, связанные с вращением всего комплекса и/или его отдельных сегментов, что отражается в появлении соответствующих корреляционных времен вращения.

Метод РВФА применим для исследования как гомогенных, так и микрогетерогенных и гетерогенных систем [53, 58]. Рассмотрим несколько примеров исследования надмолекулярных структур на основе липосом методом РВФА.

В работе [59] на примере липосом, меченых 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриеном, изучали поведение противогрибкового препарата итраконазола. Комбинацией флуоресцентных методов и метода молекулярной динамики авторы показали, что активная молекула способна вызывать упорядочивание бислоя, уменьшая подвижность гидрофобных цепей.

Методом РВФА было исследовано взаимодействие поверхностного белка из бактериофага М13 с малыми моноламеллярными везикулами димиристоилфосфатидилхолин/димиристоилфосфатидовая кислота (80/20 по массе). За флуоресценцией следили по триптофановому остатку белка [60]. Спад анизотропии характеризуется двумя корреляционными временами вращения. Короткое корреляционное время ϕ_1 (0.5 нс) отражает быстрый деполяризационный процесс внутри фрагмента белка, и долгое ϕ_2 (более 20 нс) соответствует вращению всей липосомальной системы, содержащей белок (ф_{белок + липосома}). Корреляционное время вращения, соответствующее свободному вращению белка в системе отсутствует, что указывают на полное связывание белка с липосомой.

В работе [61] с применением методов РВФА и ФКС исследовали изменение состояния липидного бислоя при окислении жирных кислот. С использованием флуоресцентного аналога фосфолипида, который способен включаться в липидный бислой ВР-С11 определяли изменение плотности упаковки липидов (по молекулярной подвижности метки в бислое – через корреляционные времена вращения) в процессе окисления ненасыщенных жирных кислот (арахидоновой кислоты) в модельном фосфолипиде. Обнаружено, что при окислении арахидоновой кислоты липидный бислой становится существенно менее подвижным. Аналогичный вывод был получен из анализа данных ФКС с использованием флуоресцентной метки монопиренил-фосфатидилхолин, где наблюдалось замедление латеральной диффузии при окислении липидов в той же липосомальной системе. В итоге определен молекулярный механизм изменения структуры бислоя при перекисном окислении липидов биомембран.

2.2.4. ЭПР-спектроскопия

Метод электронного парамагнитного резонанса дает ценную информацию о природе, основном состоянии парамагнитных центров и об их ближайшем окружении. К парамагнитным центрам можно отнести атомы и молекулы с нечетным числом электронов, ионы, имеющие частично заполненные внутренние электронные оболочки, свободные радикалы и точечные дефекты в твердых телах.

Использование ЭПР-спектроскопии для изучения биосистем ограничено, поскольку естественных парамагнитных центров в подобных объектах мало. Говоря о диагностике взаимодействия липосомальных мембран с лекарствами, целесообразно рассмотреть виды спин-меток, предназначенных для введения в толщу бислоя. Тогда информация, полученная из ЭПР-спектра метки, может быть использована для анализа текучести мембраны и обнаружения в ней дефектов.

Структура ЭПР-спектра сложна, однако современные методы математического моделирования позволяют рассчитывать предполагаемые спектры. Взаимодействие электрона только с внешним магнитным полем приводит к одиночной линии в спектре ЭПР, следует учитывать взаимодействие магнитного момента электрона с магнитным моментом расположенных поблизости ядер, так называемое сверхтонкое взаимодействие (СТВ), приводящее к дополнительному расщеплению спектральных линий парамагнитных систем в магнитном поле (так называемое сверхтонкое расщепление – СТР).

Время корреляции вращательной диффузии и константы СТВ являются основными количественными параметрами в спектрах меток-репортеров для липосом.

Неочевидным ограничением применимости метода ЭПР-спектроскопии для анализа липосомальных систем является следующий технический факт. Наиболее распространены спектрометры ЭПР, регистрирующие сигнал от порошковых образцов, однако корректная трактовка подобных результатов для липосомальных систем затруднена; необходимо искать способы регистрации спектров от жидких образцов. Существуют специальные ячейки на основе капилляров,



Рис. 11. Строение 5-доксил-стеариновой кислоты (5-ДСК) и 16-доксил-стеариновой кислоты (16-ДСК).

например, система AquaX компании Bruker, требующая небольшой объем пробы (18–30 мкл на см капиллярной системы), однако подобные установки встречаются крайне редко. Вероятно, этот факт объясняет относительно редкое использование такого ценного метода как ЭПР-спектроскопия для анализа липосомальных систем.

Метки чаще всего содержат нитроксильный радикал (рис. 11). Хорошо изучено поведение иминонитроксильных радикалов в липидном бислое: считается, что они вращаются по типу волчков с аксиальной симметрией [62].

"Излюбленными" спин-метками в изучении липосомальных систем стали 5-доксил-стеариновая кислота (5-ДСК) и 16-доксил-стеариновая кислота (16-ДСК), поскольку в совокупности информация от этих двух меток хорошо описывает



Рис. 12. Типичный ЭПР-спектр 5-ДСК и 16-ДСК меченных липосом из дипальмитоилфосфатидилхолина.

приполярный (5-ДСК) и гидрофобный участки бислоя (16-ДСК). Изменение вязкости мембраны можно оценить по изменению величины СТР 2Атах (рис. 12) в спектрах липосом, меченных 5-ДСК, поскольку оно отражает вращательную подвижность молекул липидов. Известно, что 2Атах увеличивается при понижении вязкости мембраны [63]. Из спектров 16-ДСК меченных липосом высчитывают время вращательной корреляции τ из параметров спектра W_0 , h_0 и h_{-1} (рис. 12) по уравнению (8):

$$\tau = \left(6.5 \times 10^{-10}\right) W_0 \left[\left(\frac{h_0}{h_{-1}}\right)^{0.5} - 1 \right].$$
 (8)

Увеличение времени вращательной корреляции также указывает на уменьшение вязкости бислоя.

Анализ обоих этих параметров позволил доказать, что встраивание паклитаксела в ДПФХ липосомы вызывает увеличение вязкости бислоя [63], что может быть использовано не только для создания новых лекарственных форм, но и для более глубокого понимания механизма взаимодействия активных молекул с мембраной.

Меткой могут быть ионы металлов, например, меди [64], причем ионы металлов вводятся на стадии диспергирования тонкой липидной пленки. Изменение интенсивности сигнала ЭПР спектра и расчетные значения спин-гамильтониана позволили точнее установить структуру липосомального препарата СРХ-351, содержащего цитарабин и даунорубицин: ионы меди в параллельной плоскости связываются с первой активной молекулой, а в перпендикулярной — со второй. При этом обнаружено, что даунорубицин образует комплексы с медью в стехиометрии 1 : 1 или 2 : 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизм взаимодействия лекарств с биомембраной — важнейший вопрос, который стоит при разработке новых биосовместимых форм лекарственных препаратов с улучшенными биофармацевтическими характеристиками. В первую очередь это обусловлено тем, что значительная доля активных молекул, в частности, противоспалительные нестероидные средства и большинство антибиотиков, имеют значительные побочные

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методы	Подвижность цепей	Температура фазового перехода	Морфология	Электростатическое взаимодействие	Взаимодействие с белками плазмы крови	Морфология кристаллов в липосоме
ИК-спектроскопия	+	+		+	+	
Флуоресцентные методы	+			+	+	
ЭПР-спектроскопия	+					
ДСК		+		+		
MMPP						+
Метод дифракции излучения лазера на свободных электронах						+
Методы на чипе				+	+	
Методы микроскопии			+			+

Таблица 4. Сравнение методов исследования механизма взаимодействия липосом с лекарственными препаратами

эффекты, включая фототоксичность, нарушения гемодинамики, тромбозы, гепатотоксичность и нейротоксичность. В ряде случаев механизм развития побочных эффектов обусловлен природой самого лекарства, которое, помимо воздействия на мишень в организме, вызывает неспецифические изменения в клеточной мембране. Такой эффект обнаружен, например, для нестероидных противовоспалительных средств [35]: взаимодействие активных молекул с ацильными цепями вызывает разрыхление мембраны и образование в ней дефектов. Для антибактериальных препаратов класса фторхинолонов на примере анионных липосом смешанного состава показано, что моксифлоксацин вызывает перераспределение липидов в бислое и образование гексагональных мезафаз. Подобные изменения могут приводить к нарушению целостности клеточной мембраны, увеличение тромбогенности и прочим побочным эффектам.

Описанные в представленном обзоре методы позволяют глубоко исследовать механизмы взаимодействия лекарственных веществ с липидным бислоем и выявлять тонкую структуру липосомальных формуляций активных молекул в зависимости от их химической природы и состава липидной матрицы. Однако каждый метод в отдельности зачастую не предоставляют полной картины происходящего процесса. Поэтому актуальным является вопрос комбинации методов. В табл. 4 приведено краткое резюме по информации, которую можно получить от того или иного метода. Обращают на себя внимание наиболее информативные методы: ИК-спектроскопия и группа флуоресцентных методов. Данные методы обеспечи-

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 4 2020

широкий спектр возможностей при вают исследовании состояния биомембраны при фазовых переходах, при взаимодействии липидного бислоя с лекарственными субстанциями. При изучении надмолекулярных ансамблей на основе липосом исключительно информативны методы ФКС и РВФА, которые позволяют получать детальную информацию о пространственной структуре и молекулярной подвижности как всего комплекса на основе липосом, так и его отдельных компонентов. Комбинация их с методами, предоставляющими информацию о морфологии везикул, позволяет получить полную картину взаимодействия активной молекулы с бислоем. Можно ожидать, что в ближайшем будущем область применения рассматриваемых в обзоре методов в первую очередь ИК-спектроскопии и флуоресцентных для изучения биологических объектов будет расширяться, поскольку с усовершенствованием технического оснащения станут доступными принципиально новые приложения этих методов, например, возможность слежения за динамикой отдельных везикул в растворе.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-33-00134.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит исследований с использованием людей или животных в качестве объектов исследования.

конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Manaia E.B. et al. // Int. J. Nanomedicine. 2017. V. 12. P. 4991–5011.
- Kinuta M., Takei K. // Cell Struct. Funct. 2002. V. 27. № 2. P. 63–69.
- 3. *Куликов К.Г., Кошлан Т.В.* // Журнал технической физики. 2015. V. 85. № 12. Р. 26–32.
- Yaroslavov A.A. et al. // Colloid J. 2011. V. 73. № 3. P. 430–435.
- 5. *Sánchez-Purrà M. et al.* // Int. J. Pharm. 2016. V. 511. № 2. P. 946–956.
- Kinuta M. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002.
 V. 99. № 5. P. 2842–2847.
- 7. *Deygen I.M., Kudryashova E.V.* // Russ. J. Bioorganic Chem. 2014. V. 40. № 5. P. 547–557.
- Eremenko A.V. et al. // Electroanalysis. 2012. V. 24. № 3. P. 573–580.
- Deygen I.M., Kudryashova E.V. // Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2016. V. 141. P. 36–43.
- Filipe V., Hawe A., Jiskoot W. // Pharm. Res. 2010. V. 27. № 5. P. 796–810.
- Le-Deygen I.M. et al. // Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. Elsevier Inc., 2019. V. 21. P. 102065.
- 12. *Shin M. et al.* // Mol. Pharm. 2018. V. 15. № 3. P. 721–728.
- 13. *González-Rodríguez M.L., Rabasco A.M.* // Expert Opin. Drug Deliv. 2011. V. 8. № 7. P. 857–871.
- Yaroslavov A. A. et al. // Adv. Colloid Interface Sci. 2008. V. 142. № 1–2. P. 43–52.
- 15. *Smith M.C. et al.* // Anal. Bioanal. Chem. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2017. V. 409. № 24. P. 5779–5787.
- Kim M.W., Niidome T., Lee R. // Mar. Drugs. 2019. V. 17. № 10. P. 581–593.
- 17. Singh S. // Int. J. Nanomedicine. 2018. V. 13. P. 11-13.
- Le-Deygen I.M. et al. // Chem. Phys. Lipids. 2020. V. 228. P. 104891.
- Rouf M.A. et al. // J. Liposome Res. 2009. V. 19. № 4. P. 322–331.
- Robson R.J., Dennis E.A. // J. Phys. Chem. 1977. V. 81. № 11. P. 1075–1078.
- Biltonen R.L., Lichrenberg D. // Chem. Physicis Lipids. 1993. V. 64. P. 129–142.
- 22. *Bilge D. et al.* // Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc. Elsevier B.V., 2014. V. 130. P. 250–256.
- Di Foggia M. et al. // J. Therm. Anal. Calorim. 2017. V. 127. № 2. P. 1407–1417.
- 24. *Wei X. et al.* // Mol. Pharm. 2017. V. 14. № 12. P. 4339–4345.
- Li T. et al. // J. Control. Release. 2018. V. 288. № July. P. 96–110.
- Mady M.M. et al. // Cell Biochem. Biophys. 2012. V. 62. № 3. P. 481–486.

- 27. *Perinelli D.R. et al.* // Int. J. Pharm. Elsevier. 2017. V. 534. № 1–2. P. 81–88.
- Pereira-Leite C. et al. // J. Phys. Chem. B. 2012. V. 116. № 46. P. 13608–13617.
- 29. *Cipolla D. et al.* // Pharm. Res. Pharmaceutical Research. 2016. V. 33. № 11. P. 2748–2762.
- 30. *Cipolla D. et al.* // RSC Adv. 2016. V. 6. № 8. P. 6223– 6233.
- 31. Feng L. et al. // Biomaterials. 2018. V. 181. P. 81-91.
- 32. *Kleinschmidt J.H.* // Lipid-Protein Interactions: Methods and Protocols / New York: Humana Press, 2013. 464 p.
- 33. *Toyran N., Severcan F.* // J. Mol. Struct. 2007. V. 839. № 1–3. P. 19–27.
- Deygen I.M. et al. // Langmuir. 2016. V. 32. № 42. P. 10861–10869.
- 35. *Manrique-Moreno M. et al.* // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1788. № 6. P. 1296–1303.
- Lewis R.N. et al. // Biophys. J. 1994. V. 67. № 6. P. 2367–2375.
- 37. *Manrique-Moreno M. et al.* // Lett. Drug Des. Discov. 2009. V. 7. № 1. P. 50–56.
- 38. Kuć M. et al. // Chem. Phys. 2015. V. 458. P. 9-17.
- 39. *Baird C.L., Courtenay E.S., Myszka D.G.* // Anal. Biochem. 2002. V. 310. № 1. P. 93–99.
- 40. *Ruozi B. et al.* // Int. J. Nanomedicine. 2011. V. 6. P. 557–563.
- 41. *Robson A.L. et al.* // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 1–8.
- 42. *Ruozi B. et al.* // Eur. J. Pharm. Sci. 2005. V. 25. № 1. P. 81–89.
- 43. *Takahashi N. et al.* // J. Pharm. Sci. American Pharmacists Association. 2018. V. 107. № 2. P. 717–726.
- 44. Johnston M.J.W. et al. // J. Liposome Res. 2008. V. 18. № 2. P. 145–157.
- 45. *Zhigaltsev I.V. et al.* // J. Control. Release. 2005. V. 104. № 1. P. 103–111.
- 46. *Shamrakov D. et al.* // Int. J. Pharm. 2018. V. 547. № 1–2. P. 648–655.
- 47. *Chang W.-H. et al.* // Nanoscale. 2018. V. 10. № 6. P. 2820–2824.
- 48. Alves A.C. et al. // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 1–11.
- 49. *Lianos P., Mukhopadhyay A.K., Georghiou S.* // Photochem. Photobiol. 1980. V. 32. № 3. P. 415–419.
- Macdonald A.G. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1988. V. 938. P. 231–242.
- 51. *Береговая Е.Г. и др. //* Биополимеры и клетка. 1993. Т. 9. № 5. С. 19–26.
- Boldyrev I. et al. New BODIPY lipid probes for fluorescence studies of membranes // J. Lipid Res. 2007. V. 48. № 7. P. 1518–1532.
- 53. *Кудряшова Е.В.* // Функционирование и структура белков на поверхностях раздела фаз. Новые методы исследования / Palmarium Academic Publishing AV Akademikerverlag GmbH & Co., 2013. 146 p.
- 54. *Paul B.K., Ghosh N., Mukherjee S. //* Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2018. V. 170. P. 36–44.
- *Mittag J.J. et al.* // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2017. V. 119. P. 215–223.

- Cundall R., Dale R.E. // Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy in Biochemistry and Biology / Eds. Cundall R.B., Dale R.E. New York: Plenum Press, 1983. P. 555–605.
- Krishnamoorthy G. // J. Biosci. Springer India. 2018. V. 43. № 3. P. 555–567.
- 58. *Кудряшова Е.В., Гладилин А.К., Левашов А.В.* // Успехи биологической химии. 2002. Т. 42. С. 257–294.
- *Poojari C. et al.* // Chem. Phys. Lipids. 2019. V. 223. P. 104784.
- Van Slooten M.L. et al. // J. Pharm. Sci. 2000. V. 89. № 12. P. 1605–1619.
- 61. *Borst J.W. et al.* // Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids. 2000. V. 1487. № 1. P. 61–73.
- 62. Иванов Л.В., Картель Н.Т. // Reports Natl. Acad. Sci. Ukr. 2012. V. 5. P. 139–145.
- 63. *Zhao L. et al.* // Int. J. Pharm. 2007. V. 338. № 1–2. P. 258–266.
- 64. *Dicko A. et al.* // Int. J. Pharm. 2010. V. 391. № 1–2. P. 248–259.

Experimental Methods for Studying the Mechanism of Interaction of Lipid Membranes with Low-Molecular Drugs

I. M. Le-Deygen*, #, A. A. Skuredina*, and E. V. Kudryashova*

[#]Phone: +7(495)939-34-34; e-mail: i.m.devgen@gmail.com

*Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Leninskie gory 1, str. 3. Moscow, 119991 Russia

The review is devoted to methods for studying the mechanism of interaction of lipid membranes with low molecular weight drugs. The following methods are considered in the review: IR and EPR spectroscopy, fluorescence analysis, differential scanning calorimetry, and microscopy methods. Methods for characterizing the size and charge of vesicles are also considered: dynamic light scattering and analysis of the trajectory of nanoparticles. Methods are divided into requiring additional labels and not requiring. An important objective of the review, in addition to analyzing the latest achievements of instrumental methods of analysis, is to find the optimal research strategy by selecting informative, modern approaches to studying the interaction of drugs with lipid membranes.

Keywords: liposomes, IR spectroscopy, EPR spectroscopy, fluorescence methods, differential scanning calorimetry



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 4, с. 360–368

—— МИНИ-ОБЗОР —

УДК 577.112.083,577.112.4,577.112.7

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТКИ В БИОЛОГИИ. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

© 2020 г. Н. В. Плетнева*, Е. А. Горячева*, И. В. Артемьев*, С. Ф. Архипова*, В. З. Плетнев*, #

*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7

> Поступила в редакцию 28.01.2020 г. После доработки 13.02.2020 г. Принята к публикации 18.02.2020 г.

В клеточной биологии для визуализации и изучения процессов в живых организмах, мониторинга экспрессии генов, локализации и миграции интересующих белков и клеток, определения жизненно важных внутриклеточных характеристик широко используются флуоресцентные метки различной природы. В обзоре рассмотрены пространственная организация, а также достоинства и недостатки наиболее перспективных молекулярных инструментов, получивших широкое применение в биологии.

Ключевые слова: пространственная структура, флуоресцентные метки, биомаркеры, низкомолекулярные флуорофоры, квантовые точки, GFP-подобные белки, фоторецепторы, фитохромы, флавопротеины, липокалины

DOI: 10.31857/S0132342320040223

ВВЕДЕНИЕ

Бурное развитие направлений по созданию флуоресцентных инструментов как низкомолекулярной, так и белковой природы продиктовано насущными потребностями биологии и биомедицины для изучения процессов в живых организмах. Значительный прогресс в этой области был отмечен в последнее время двумя Нобелевскими премиями по химии: 2008 г. – за открытие и использование зеленого флуоресцентного белка GFP и 2014 г. – за создание флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения. В настоящее время создание флуоресцентных меток для биологии развивается по четырем направлениям: 1) органические и неорганические низкомолекулярные флуорофоры, 2) GFP-подобные белки с хромофором, образующимся в как часть полипептидной цепи результате посттрансляционной модификации, 3) фоторецепторы (домены фитохромов и флавопротеинов), автокаталитически связывающие присутствующие в клетке природные хромофоры, 4) флуороген-активирующие белки (антитела и липокалины), образующие нековалентные специфические комплексы с органическими низкомолекулярными флуорогенами различной природы. Создание новых флуоресцентных конструкций на основе белковых платформ включает рациональный дизайн, основанный на сайт-направленном мутагенезе, и направленную эволюцию, основанную на оптимизации свойств методом случайного мутагенеза.

I. ОРГАНИЧЕСКИЕ И НЕОРГАНИЧЕСКИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФЛУОРОФОРЫ

Флуоресцентные органические соединения, представленные многочисленной группой малых молекул, формируют ансамбль эффективных инструментов для визуализации процессов в живых клетках и организмах. С момента первого синтеза флуоресцеина в 1871 г. органические низкомолекулярные флуорофоры успешно используются в клеточной биологии [1-4]. Индивидуальные флуорофоры нашли применение для стехиометрического маркирования практически любого белка даже в живых клетках. Другие флуорофоры обладают свойством специфического связывания с ДНК или с биологическими мембранами. В настоящее время разнообразие свойств таких флуоресцентных меток позволяет определять ионы металлов и рН среды, изучать активность ферментов и сигнальных молекул. Благодаря высокой яркости и фотостабильности метки локализуются с нанометрической точностью современными высокочувствительными методами спектроскопии - PALM (photoactivated localization microscopy), STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) [5, 6]. Используемые в практике флуорофоры относятся к группе красителей, представленной большим набором химических структур (рис. 1) [4]. Соеди-

[#] Автор для связи: (эл. почта: vzpletnev@gmail.com).



Рис. 1. Примеры химических структур синтетических органических низкомолекулярных флуорофоров [4], демонстрирующих эмиссию в голубой (с условным центром при ~460 нм), зеленой (~515), желтой (~540), красной (~610) и ближней инфракрасной (~800 нм) областях спектра.

нения характеризуются плоской структурой с сопряженной π-электронной системой.

Неорганические низкомолекулярные флуорофоры (называемые квантовыми точками) на основе металлов с полупроводниковыми свойствами дают дополнительные возможности для биологических исследований [7]. Эти метки в виде флуоресцентных солюбилизированных нанокристаллов вводятся в изучаемый объект непосредственно или после присоединения к их поверхности специальных распознающих молекул (антител или олигонуклеотидов), обеспечивающих адресное связывание. Будучи внедренными в полимерные матрицы в форме коллоидных нанокристаллов они становятся чрезвычайно устойчивыми. Квантовые точки обладают уникальными оптическими характеристиками — высокой фотостабильностью, яркой флуоресценций (до 10 цветов в видимом диапазоне) с узким симметричным пиком (в отличие от органических красителей, имеющих длинноволновый "хвост") и широкой полосой возбуждения, которая позволяет возбуждать нанокристаллы разных цветов одним источником излучения. Эти свойства, а также высокая фотостабильность нанокристаллов, делают их идеальными флуорофорами для многоцветного спектрального мечения биологических объектов. Уникальные свойства нанокристаллов позволяют использовать их практически во всех системах мечения и визуализации биологических объектов (за исключением в качестве экспрессируемых генетически внутриклеточных меток, к которым относятся широко известные флуоресцентные белки). На основе неорганических флуорофоров конструируют элементы электронных и оптоэлектронных устройств, сенсоры для анализов вещества в микрообъемах, различные флуоресцентные, хемилюминесцентные и фотоэлектрохимические датчики.

II. GFP-ПОДОБНЫЕ БЕЛКИ

Наиболее широкое применение в качестве генетически кодируемых меток нашли GFP-подобные флуоресцентные белки (ФБ) из морских организмов [8]. Природные ФБ (~27 кДа) и их синие, зеленые, желтые, красные и дальнекрасные генно-инженерные варианты показывают экстраординарную способность спонтанно генерировать флуоресценцию. Спектральное разнообразие ФБ сделало возможным многоцветное мечение биологических тканей. Благодаря свойству флуоресценции GFP-подобные белки широко используются в клеточной биологии, биотехнологии и биомедицине в качестве биомаркеров для визуализации процессов в живых организмах, мониторинга экспрессии генов, локализации и миграции интересующих белков и клеток, определения жизненно важных внутриклеточных характеристик, таких как pH, концентрация ионов, температуры. Молекулярные инструменты на их основе нашли успешное применение при изучении развития раковой опухоли у животных in vivo, включая перемещение раковых клеток, инвазию, метастазирование, ангиогенез, а также для быстрого скрининга потенциальных лекарственных средств. В этой связи, просматривается хорошая перспектива использования отдельных фототоксичных генно-инженерных вариантов для фотоиндуцированной терапии рака у человека [9]. Уникальность свойств ФБ предопределила создание специфичных биосенсоров различного назначения (в частности, для измерения концентрации ионов, активностей отдельных ферментов), основанных на методе индуктивно-резонансного переноса энергии в донорно-акцепторных FRET (Forster resonance energy transfer) парах. В большинстве случаев, практическое применение ФБ требует создания мономерных вариантов с эмиссией в дальнекрасной области спектра, обладающих высоким квантовым выходом, высокой скоростью созревания хромофора и фотостабильностью. Флуоресцентные белки, обладающие эмиссией в красной и особенно в дальнекрасной (длина волны эмиссии $\lambda_{_{\rm ЭM}} > 610$ нм) областях спектра, представляют особый практический интерес для визуализации биологических процессов. Их излучение характеризуется более высокой проницаемостью через биологические ткани по сравнению с эмиссией меньшей длиной волны. Кроме того, излучение в дальнекрасной области, характеризуемое большей длиной волны и, соответственно, меньшей энергией кванта, вызывает меньшее повреждение маркируемых биологических объектов. В более сложных конструкциях биосенсоров исключительно актуальной остается задача создания эффективных FRET-пар на основе желто/оранжевых доноров и красных/дальнекрасных акцепторов. При рациональном конструировании биомаркеров/биосенсоров важно понять, каким образом особенности стереохимии белка определяют его основные фотофизические свойства, включая скорость и полноту созревания, склонность к олигомеризации и характеристики цветового спектра. Эти знания необходимы для разработки рационального подхода по созданию улучшенных вариантов, удовлетворяющих требуемым критериям для практического использования.

Их пространственная структура принимает форму закрытого с торцов β-бочонка, сформированного из 11-ти антипараллельных β-тяжей и одной α-спирали, в середине которой располагается хромофор, образованный из трех аминокислотных остатков X-Tvr-Gly в результате посттрансляционной автокаталитической модификации в присутствии молекулярного кислорода (рис. 2) [10-12]. Первый остаток — вариабельный, остальные два консервативные. Олигомерная структура ФБ дикого типа представлена димерами или тетрамерами (рис. 3). Мономеры в составе димера тяготеют к антипараллельному взаимному расположению, а димеры в составе тетрамера – к перпендикулярному. Поверхность мономеров в тетрамере формирует два типа стабилизирующих олигомерную структуру межсубъединичных интерфейсов: ИФ1 – между субъединицами в одном димере и ИФ2 – между субъединицами в разных димеров (рис. 4) [13]. Олигомерная структура на интерфейсах стабилизирована большим количеством водородных связей между гидрофильными остатками, солевых мостиков между заряженными остатками (Lys/Arg и Glu/Asp) и гидрофобными кластерами между неполярными остатками. Хромофор располагается в центральной полости, сформированной из ближайших аминокислотных остатков (рис. 5). Фотофизические характеристики таких ФБ в значительной степени зависят от структуры зрелого хромофора и его ближайшего аминокислотного окружения. Остатки вокруг хромофора образуют между собой развитую сеть водородных связей, которая в свою очередь активно взаимодействует с хромофором путем образования водородных связей, как прямых, так и опосредованных молекулами воды. В структурах фототоксичных представителей GFP-подобных белков, KillerRed и KillerOrange, обнаружен уникальный канал, про-

362



Рис. 2. (*a*) Пространственная структура GFP-подобных белков, (*б*) структура хромофора в белках дикого типа (сопряженная система двойных связей выделена серым фоном).

стирающийся от области хромофора до торцевой части β-бочонка (рис. 6) [14, 15]. Канал заполнен цепочкой из связанных водородными связями молекул воды, предположительно формирующую транспортную систему для генерируемых токсичных форм кислорода.

III. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТКИ НА ОСНОВЕ ФОТОРЕЦЕПТОРОВ

Другая уникальная группа флуоресцентных белков представлена светочувствительными фоторецепторами, способными автокаталитически связывать присутствующие в клетке природные хромофоры. Эти инструменты отличаются природой белковой платформы, представленной в основном бактериальными фитохромами и нуклеотид-связывающими доменами флавопротеинов (LOV, BLUF), а также природой связанного хромофора, среди которых наиболее часто фигурируют биливердин, флавинмоно(ди)нуклеотид (ФМН и ФДН) и флавинадениндинуклеотид (ФАДН) [16–19]. Биомаркеры и биосенсоры на основе природных и генноинженерных вариантов фоторецепторов обладают уникальными фотофизическими характеристиками, отсутствующими у GFP-подобных маркеров – флуоресценцией в ближней инфракрасной области, независимостью от кислорода, малыми размерами и повышенной фотосенсибилизационной активностью. Благодаря своим уникальным возможностям, они позволяют детектировать, визуализировать и контролировать биологические процессы с исключительно высокой пространственно-временной точностью. Эта особенность обусловливает специфику их применения в качестве генетически кодируемых флуоресцент-

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 4 2020

ных биомаркеров, биосенсоров и оптогенетических инструментов. Флуоресцентные биомаркеры на их основе, излучающие в ближней инфракрасной области ($\lambda_{_{ЭМ}} > 700$ нм), позволяют визуализировать процессы в глубинных отделах биологических тканей. Генетически кодируемые фотосенсибилизаторы, генерирующие активные формы кислорода (синглетный кислород или супероксид анион), позволяют целевым образом инактивировать индивидуальные белки, органеллы, клетки, нуклеиновые кислоты. В качестве оптогене-



Рис. 3. Структура тетрамера GFP-подобных белков, состоящего из двух димеров CB и AD.

тических меток они нашли эффективное применение в исследованиях работы нервных клеток.

К одной из наиболее перспективных белковых платформ, используемых для создания флуоресцентных биомаркеров, относятся фитохромы. Они найдены в различных источниках – растениях, грибах, водорослях, бактериях и состоят из четырех доменов. Способность таких биомаркеров поглощать и испускать свет в дальнекрасной и ближней-инфракрасной спектральных областях обусловлена способностью олного из ломенов белка связывать линейный хромофор тетрапирролового ряда. Одна из наиболее распространенных флуоресцентных конструкций на основе бактериальных фитохромов обладает способностью специфически связывать биливердин – флуорофор, присутствующий в клетке и представляющий собой продукт деградации гемоглобина [16, 20, 21]. Поглошение света вызывает фотоизомеризацию биливердина относительно одной из его связей и последующее его ковалентное связывание в полости белка. На основе фрагмента белка, состоящего из светочувствительного PAS и биливердин-связывающего GAF-доменов, а также на основе только GAF-домена, был осуществлен генно-инженерный дизайн серии эффективных флуоресцентных конструкций с эмиссией в дальнекрасной и ближней инфракрасной областях (рис. 7) [16, 20, 21]. Структура PAS-домена построена из β шпильки и трех α-спиралей, фланкирующих шпильку с трех сторон – слева, справа и сверху. Ключевой хромофорсвязывающий GAF-домен принимает структуру α - β - α сэндвича, состоящего из 5-сегментного β-слоя и двух α-спиралей, формирующих хромофор-связывающую полость, а также трех α-спиралей с противоположной от β-слоя стороны. В связывающей полости разных генно-инженерных вариантов фитохромов хромофор может образовывать ковалентную связь, как с двумя остатками Cys20 и Cys253 одновременно, так и с каждым из них по отдельности.

Необходимость использования хромофор-несущей платформы на основе нуклеотид-связывающих доменов (LOV, BLUF) флавопротеинов [17-19, 22, 23] вызвана рядом внутренних ограничений GFP-подобных белков, а именно: потребность в кислороде при созревании хромофора, относительно большие размеры, ограниченная способность проникновения через клеточные мембраны и существенно пониженная стабильность при pH < 5. Генно-инженерные варианты этих доменов способны на начальном этапе нековалентно связывать флуорофоры – ФМН, ФДН или ФАДН (кофакторы, присутствующие в растительных и животных клетках), которые при фотовозбуждении светом в диапазоне 300-500 нм образует ковалентную связь с остатком цистеина белка.



Рис. 4. Типичные структуры интерфейсов GFP-подобных белков, демонстрирующие стабилизирующее взаимодействие боковых цепей (a) между мономерами в димере и (δ) между мономерами разных димеров в тетрамере.



Рис. 5. Типичный пример ближайшего окружения хромофора в зеленом ФБ – EGFPv [32].

К основному преимуществу ФМН/ФДН/ ФАДН-связывающих конструкций относят независимость их образования от кислорода; при переходе из аэробной среды в анаэробную флуоресцентный сигнал остается неизменным. Они характеризуются небольшим размером – порядка



Рис. 6. Внутренний канал в структуре красного GFPподобного белка KillerRed с цепочкой связанных водородными связями молекул воды, осуществляющей транспорт активных форм кислорода (показаны шариками) [14].



Рис. 7. Структура комплекса бактериофитохрома с биливердином [21].

100-150 аминокислотных остатков (относительно 238 в GFP белках), продолжительным временем жизни, достигающим 5.7 нс, и повышенной стабильностью фотофизических характеристик в широком диапазоне рН. Пространственная структура LOV/BLUF доменов флавопротеинов относится к α/β типу и представляет собой изогнутый смешанного типа β-слой из 5 β-тяжей, фланкированный 4 α-спиралями – по две с каждой стороны (рис. 8) [22, 24-27]. Генно-инженерные методы позволяют адаптировать внутреннюю полость домена к высокоаффинному связыванию ФМН/ ФДН кофакторов. На основе LOV-домена (Arabidopsis phototropin) был сконструирован эффективный флуоресцентный фотосенсибилизатор с высоким квантовым выходом (~0.47), названный miniSOG (mini Singlet Oxygen Generator) [28, 29]. Это небольшая мономерная конструкция (106 остатков; $\lambda_{_{\rm ЭМ}} \sim 500/528$ нм), связывающая ФМН с субнаномолярной аффинностью и обладающая уникальным свойством фототоксичности. При облучении светом (~450 нм) miniSOG генерирует токсичную форму кислорода (синглетный кислород). Это свойство нашло эффективное использование при мечении, окислении и инактивации целевых белков и клеточных органелл.

IV. БИОМАРКЕРЫ НА ОСНОВЕ ФЛУОРОГЕН-АКТИВИРУЮЩИХ БЕЛКОВ

В последнее время получили развитие новые направления по созданию флуоресцентных конструкций, основанных на органических красителях (флуорогенах), которые в растворе не флуоресцентны, но проявляют яркую флуоресценцию в специфическом нековалентном комплексе с флуороген-активирующими белками (ФАБ) [30].

Одно из них связано с конструированием специфических комплексов антител с флуорогенами различной природы. В качестве примера можно привести тройной комплекс легкой цепи (L5*V₁s) вариабельного домена антитела человека (несущим по сравнению с диким типом одну мутацию Leu89Ser) с зеленым малахитовым красителем (MG) [31]. Полученный комплекс демонстрирует эмиссию в дальнекрасной области спектра $(\lambda_{_{3M}} \sim 670 \text{ нм})$, характеризующуюся повышенной проницаемостью через биологические ткани. Причем его флуоресценция сравнима по яркости (QY ~ ~ 0.24) с такими коммерческими ФБ, как EGFP [32] и mCherry [33]. В структуре тройного комплекса одна молекула MG располагается в полости между двумя расположенными антипараллельно иммунобелковыми мономерами, имеющими β-структурную природу (рис. 9).

Другое перспективное направление связано с созданием флуоресцентных конструкций на основе липид-переносящих белков — липокалинов



Рис. 8. Структура комплекса LOV домена флавопротеина с флавинадениндинуклеотидом [22].

(18-40 кДа) [34-36]. Несмотря на существенное различие в аминокислотной последовательности, липокалины характеризуются удивительно похожей пространственной структурой, представляющей собой β-бочонок из 8 антипараллельных скрученных вокруг центральной оси В-тяжей и С-концевой α-спирали [37-41]. Структура липокалинов характеризуется наличием узкой вытянутой полости, которую с помощью мутагенеза можно адаптировать для специфического связывания и активации низкомолекулярных флуорогенов различной природы. На рис. 10 показана структура генно-инженерного варианта липокалина FluA, полученная из билин-связывающего белка путем 16 аминокислотных замен в связывающей полости и обладающая высоким родством к флуоресцеину [39]. Совсем недавно на основе генно-инженерного варианта бактериального липокалина Blc и синтетического GFP-подобного хромофора была получена серия ярких желтых флуоресцентных биомаркеров, обладающих по сравнению со спектрально-близкими GFP-подобными белками существенно более высокой фотостабильностью [42]. Специфичность связывания в структуре комплекса была достигнута за счет комплементарности взаимного расположения полярных частей хромофора и связывающей полости.



Рис. 9. Структура тройного комплекса легкой цепи вариабельного домена антитела человека с зеленым малахитовым флуорофором [31].



Рис. 10. Структура комплекса антикалина FluA с флуоресцеином [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкий диапазон исследований в клеточной биологии. биотехнологии и биомелишине постоянно выдвигает разнообразные требования к созданию специализированных соединений различного цветовой гаммы для практического использования в качестве флуоресцентных маркеров изучаемых биологических объектов. Исследования по созданию и структурно-функциональному изучению новых перспективных биомаркеров продолжаются. Перед разработчиками встают все более сложные задачи по получению совершенных молекулярных инструментов различного цветового диапазона с улучшенными фотофизическими характеристиками. При создании новых флуореспентных меток с улучшенными свойствами важную роль играют рентгеноструктурные исследования. Они позволяют установить структурно-функциональные взаимосвязи биомаркеров, которые служат руководством для целенаправленного изменения их свойств в соответствии с требованиями современных методов исследований.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена по программе НИР (№ гос. регистрации АААА-А19-119042590107-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит исследований с использованием людей или животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wysocki L.M., Lavis L.D. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2011. V. 15. P. 752–759.
- van de Linde S., Aufmkolk S., Franke C., Holm T., Klein T., Loschberger A., Proppert S., Wolter S., Sauer M. // Chem. Biol. 2013. V. 20. P. 8–18.
- Terai T., Nagano T. // Pflugers Arch. 2013. V. 465. P. 347–359.
- Xu W., Zeng Z., Jiang J.H., Chang Y.T., Yuan L. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2016. V. 55. P. 13658–13699.
- Heilemann M., van de Linde S., Schuttpelz M., Kasper R., Seefeldt B., Mukherjee A., Tinnefeld P., Sauer M. // Angew Chem. Int. Ed. Engl. 2008. V. 47. P. 6172–6176.
- Shroff H., Galbraith C.G., Galbraith J.A., Betzig E. // Nat. Methods. 2008. V. 5. P. 417–423.
- 7. Олейников В.А. // Природа. 2010. Т. 3. С. 22-28.
- 8. *Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. //* Physiol. Rev. 2010. V. 90. P. 1103–1163.

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 4 2020

- Hoffman R.M. // Curr. Top. Dev. Biol. 2005. V. 70. P. 121–144.
- 10. *Tsien R.Y.* // Annu. Rev. Biochem. 1998. V. 67. P. 509–544.
- Pletnev V.Z., Pletneva N.V., Sarkisyan K.S., Mishin A.S., Lukyanov K.A., Goryacheva E.A., Ziganshin R.H., Dauter Z., Pletnev S. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2015. V. 71. P. 1699–1707.
- Pletnev V.Z., Pletneva N.V., Lukyanov K.A., Souslova E.A., Fradkov A.F., Chudakov D.M., Chepurnykh T., Yampolsky I.V., Wlodawer A., Dauter Z., Pletnev S. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2013. V. 69. P. 1850–1860.
- Pletneva N.V., Pletnev S., Pakhomov A.A., Chertkova R.V., Martynov V.I., Muslinkina L., Dauter Z., Pletnev V.Z. // Acta Crystallogr. D Struct. Biol. 2016. V. 72. P. 922–932.
- Pletnev S., Gurskaya N.G., Pletneva N.V., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Martynov V.I., Popov V.O., Kovalchuk M.V., Wlodawer A., Dauter Z., Pletnev V. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 32028–32039.
- Pletneva N.V., Pletnev V.Z., Sarkisyan K.S., Gorbachev D.A., Egorov E.S., Mishin A.S., Lukyanov K.A., Dauter Z., Pletnev S. // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0145740.
- Anders K., Essen L.O. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2015. V. 35. P. 7–16.
- Mukherjee A., Schroeder C.M. // Curr. Opin. Biotechnol. 2015. V. 31. P. 16–23.
- Shcherbakova D.M., Shemetov A.A., Kaberniuk A.A., Verkhusha V.V. // Annu. Rev. Biochem. 2015. V. 84. P. 519–550.
- 19. Buckley A.M., Petersen J., Roe A.J., Douce G.R., Christie J.M. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2015. V. 27. P. 39–45.
- 20. Piatkevich K.D., Subach F.V., Verkhusha V.V. // Nat. Commun. 2013. V. 4. P. 2153.
- Bhattacharya S., Auldridge M.E., Lehtivuori H., Ihalainen J.A., Forest K.T. // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. P. 32144–32152.
- Christie J.M., Hitomi K., Arvai A.S., Hartfield K.A., Mettlen M., Pratt A.J., Tainer J.A., Getzoff E.D. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. P. 22295–22304.
- 23. Walter J., Hausmann S., Drepper T., Puls M., Eggert T., Dihne M. // PLoS One. 2012. V. 7. P. e43921.
- 24. Anderson S., Dragnea V., Masuda S., Ybe J., Moffat K., Bauer C. // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 7998–8005.
- Jung A., Domratcheva T., Tarutina M., Wu Q., Ko W.H., Shoeman R.L., Gomelsky M., Gardner K.H., Schlichting I. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 12350–12355.
- Rollen K., Granzin J., Panwalkar V., Arinkin V., Rani R., Hartmann R., Krauss U., Jaeger K.E., Willbold D., Batra-Safferling R. // J. Mol. Biol. 2016. V. 428. P. 3721–3736.
- 27. *Wu Q., Gardner K.H.* // Biochemistry. 2009. V. 48. P. 2620–2629.
- 28. Xu S., Chisholm A.D. // Sci Rep. 2016. V. 6. P. 21271.
- 29. Shu X., Lev-Ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Davidson M.W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. // PLoS Biol. 2011. V. 9. P. e1001041.
- Bruchez M.P. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2015. V. 27. P. 18–23.

- Szent-Gyorgyi C., Stanfield R.L., Andreko S., Dempsey A., Ahmed M., Capek S., Waggoner A.S., Wilson I.A., Bruchez M.P. // J. Mol. Biol. 2013. V. 425. P. 4595–4613.
- Плетнева Н.В., Плетнев С.В., Богданов А.М., Горячева Е.А., Артемьев И.В., Суслова Е.А., Архипова С.Ф., Плетнев В.З. // Биоорган. химия. 2014. Т. 40. С. 414–420. [Pletneva N.V., Pletnev S.V., Bogdanov A.M., Goriacheva E.A., Artem'ev I.V., Suslova E.A., Arkhipova S.F., Pletnev V.Z. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2014. V. 40. P. 383–389.]
- 33. Shu X., Shaner N.C., Yarbrough C.A., Tsien R.Y., Remington S.J. // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 9639–9647.
- 34. Flower D.R. // Biochem. J. 1996. V. 318 (Pt 1). P. 1–14.
- Bishop R.E. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1482. P. 73–83.
- 36. Skerra A. // FEBS J. 2008. V. 275. P. 2677-2683.

- Huber R., Schneider M., Mayr I., Muller R., Deutzmann R., Suter F., Zuber H., Falk H., Kayser H. // J. Mol. Biol. 1987. V. 198. P. 499–513.
- Korndorfer I.P., Schlehuber S., Skerra A. // J. Mol. Biol. 2003. V. 330. P. 385–396.
- Korndorfer I.P., Beste G., Skerra A. // Proteins. 2003. V. 53. P. 121–129.
- 40. Ghosh S., Yu C.L., Ferraro D.J., Sudha S., Pal S.K., Schaefer W.F., Gibson D.T., Ramaswamy S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P. 11513–11518.
- Campanacci V., Nurizzo D., Spinelli S., Valencia C., Tegoni M., Cambillau C. // FEBS Lett. 2004. V. 562. P. 183–188.
- Bozhanova N., Baranov M., Klementieva N., Sarkisyan K., Gavrikov A., Yampolsky I., Zagaynova E., Lukyanov S., Lukyanov K., Mishin A. // Chem. Sci. 2017. V. 8. P. 7138–7142.

Fluorescent Tags in Biology. Three Dimensional Structure

N. V. Pletneva*, E. A. Goryacheva*, I. V. Artemyev*, S. F. Arkhipova*, and V. Z. Pletnev*,

[#]E-mail: vzpletnev@gmail.com

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

Fluorescent tags of various nature are widely used in cell biology for visualization and study processes in living organisms including gene expression, localization and migration of proteins and cells of interest, determination of the vital intracellular characteristics such as pH, ion concentration, temperature, etc. The review presents an overview of the three dimensional organization as well as advantages and disadvantages of the most promising fluorescent molecular instruments that have been widely used in biology.

Keywords: 3D structure, fluorescent tags, biomarkers, low-molecular-weight fluorophores, quantum dots, GFP-like proteins, photoreceptors, phytochromes, flavoproteins, lipocalins



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 4, с. 369–384

= ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ =

УДК 577.25:57.053

ЗНАЧЕНИЕ рН-СЕНСОРОВ В ПОДДЕРЖАНИИ ГОМЕОСТАЗА НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

© 2020 г. О. В. Серова^{*, #}, Е. А. Ганцова^{*}, И. Е. Деев^{*}, А. Г. Петренко^{*}

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

> Поступила в редакцию 20.12.2019 г. После доработки 25.12.2019 г. Принята к публикации 31.12.2019 г.

Поддержание гомеостаза pH имеет жизненно важное значение для всех клеток млекопитающих, так как ионы водорода и гидроксилов выполняют важные функции в регуляции метаболизма. На сегодняшний день считается, что в нервной системе поддержание pH в нейтральном диапазоне (pH 7.2–7.6) является абсолютно необходимым для ее нормального функционирования, при этом малые изменения pH влияют на возбудимость нейронов, синаптическую передачу, транспорт нейромедиаторов и межклеточную коммуникацию. Чувствительность к изменению pH среды является особенностью многих мембранных белков, которые играют ключевую роль в нейропередаче. Исследования последних лет выявили наличие в нервной системе белковых молекул, являющихся сенсорами существенного изменения pH внеклеточной среды как в кислую (до pH 5), так и щелочную (до pH 9) область. Установлено, что изменение pH внеклеточной среды вызывает различные клеточные ответы, в которых участвуют ионные каналы, ионотропные рецепторы, G-белок-сопряженные рецепторы, коннексины и рецепторные тирозинкиназы. Наличие данных белков в нервной системе позволяет предположить, что локальные сдвиги кислотно-щелочного равновесия являются одним из ключевых факторов, регулирующим нейрональную активность. В настоящем обзоре описаны свойства нейрональных рН-чувствительных белков.

Ключевые слова: кислотно-щелочной баланс, pH в нервной системе, pH-сенсоры, IRR DOI: 10.31857/S0132342320040260

ВВЕДЕНИЕ

Поддержание гомеостаза pH имеет жизненно важное значение для всех клеток млекопитающих, так как ионы водорода и гидроксилов выполняют важные функции в регуляции метаболизма. Процессы, которые протекают в зависимости от баланса кислотно-щелочного равновесия, включают в себя: протонирование и депротонирование молекул белков, регуляцию ферментативной активности, модуляцию мембранной текучести, поддержание ионного статуса клеточных метаболитов, передачу сигнала внутри и между клетками, синтез АТФ, контроль синтеза ДНК и белков, регуляцию клеточного объема, апоптоз, посттрансляционную модификацию белков и сортировку липидов.

Экспериментально установлено, что изменение pH внеклеточной среды вызывает различные клеточные ответы, в которых участвуют ионные каналы, ионотропные рецепторы, G-белоксопряженные рецепторы, рецепторные тирозинкиназы, коннексины. Наличие данных белков в нервной системе позволяет предположить, что локальные сдвиги кислотно-щелочного равновесия являются одним из ключевых факторов, регулирующим нейрональную активность. В настоящем обзоре описаны свойства нейрональных pH-сенсоров и данные, свидетельствующие в пользу данной гипотезы.

Поддержание гомеостаза рН в нервной системе. Показатели рН крови и, особенно, мозга поддерживаются на достаточно стабильном уровне [1–3]. В регуляции кислотно-щелочного равновесия задействованы несколько механизмов, связанных с буферными свойствами крови, выделительной функ-

Сокращения: ASIC (acid-sensing ion channels) – кислоточувствительный ионный канал; RTN (retrotrapezoid nucleus), Kir (Inwardly-rectifying potassium channels) – калиевые каналы внутреннего выпрямления; VGCC (voltage-gated calcium channel) – потенциал-зависимый кальциевый канал; NMDAR (N-methyl-D-aspartate receptor) – рецептор N-метил-D-аспартата; GABA receptor (gamma-aminobutyric acid receptor) – рецептор гамма-аминомаслянной кислоты; IRR (insulin receptor-related receptor) – рецептор, подобный рецептору инсулина; IR (insulin receptor) – рецептор инсулина; IGF-IR (insulin-like growth factor I receptor) – рецептор инсулино-подобного фактора роста I; IGF-I (insulinlike growth factor I) – инсулино-подобный фактор роста I; NGF (nerve growth factor) – фактор роста нервов.

[#] Автор для связи: (эл. почта: oxana.serova@gmail.com).

цией почек, газообменом в легких. Буферные свойства обусловлены содержанием в крови или других жидкостях бикарбонатов, неорганических фосфатов и белков, которые соединяются с избытком кислот или оснований и образуют вещества, не влияющие на рН. Почки регулируют кислотнощелочное равновесие, увеличивая или снижая

концентрацию ионов HCO_3^- и H^+ в жидкостях организма. При этом изменения pH происходят медленно — в течение нескольких часов или даже суток. Намного более быстрая регуляция pH (несколько минут) происходит с помощью газообмена. В зависимости от состояния кислотно-щелочного равновесия дыхательный цикл меняется так, чтобы через усиление или ослабление поступления кислорода и выделения углекислого газа нормализовать кислотно-щелочной баланс мозга.

Изменение рН (или рСО₂) в нервной системе вызывает скоординированный ответ, который модулирует контроль дыхания для поддержания уровней артериального рСО2. Это явление известно как центральная хеморецепция и включает активацию нейронов, чувствительных к ионам H⁺ или СО2 посредством нескольких пока мало изученных молекулярных механизмов в разных участках заднего мозга. включая retrotrapezoid nucleus (RTN). parafacial respiratory group (pFRG), Bötzinger nucleus, pre-Bötzinger complex (preBötC), rostral and caudal ventral respiratory group (rVRG and cVRG), caudal nucleus tractus solitarious (cNTS), lateral hypothalamus (LHA), fastigial nucleus (FN), medullary raphe и locus coeruleus [4, 5]. На молекулярном уровне чувствительность нейронов к изменениям pH определяется экспрессией ионных каналов, ионотропных рецепторов, G-белоксопряженных рецепторов. Недавние исследования указывают также на важную роль астроцитов в поддержании физиологического уровня рН в мозге. Предложено несколько механизмов хеморецепции астроцитов. К изменению концентрации Н⁺ могут быть чувствительны ионные каналы TRP (transient receptor potential channels, каналы транзиентного рецепторного потенциала), экспрессирующиеся на поверхности астроцитов [6], Са²⁺-активируемые К⁺ каналы, потенциал-зависимые К⁺ каналы и калиевые каналы Kir [7]. Карбоангидраза в клетке катализирует превращение СО2 в угольную кислоту, которая в свою очередь диссоциирует с об-

разованием HCO_3^- и H⁺. Повышение внутриклеточной концентрации ионов H⁺ может активировать ионные каналы, транспортеры и обменники, вызывая таким образом клеточный ответ на повышение pCO_2 [5]. CO_2 может напрямую воздействовать на коннексины (connnexins) pH-чувствительных астроцитов. Также было показано, что закисление активирует Na⁺/HCO₃⁻-котранспортер в астроцитах ствола мозга, что приводит к увеличению транспорта ионов Na⁺ внутрь клетки. Повышение внутриклеточного Na⁺ активирует Na⁺/Ca²⁺-обменник, действующий в обратном направлении, Na⁺ выводится из клетки взамен на ионы Ca²⁺. Повышение внутриклеточной концентрации Ca²⁺ приводит к увеличению экзоцитоза визикул, содержащих АТФ [8]. АТФ, в свою очередь, приводит к активации хемочувствительных нейронов RTN [9, 10]. Далее будут подробно рассмотрены pH-чувствительные белки, экспрессирующиеся в мозге.

СЕНСОРЫ ВНЕКЛЕТОЧНОГО рН В МОЗГЕ

Ионные каналы

ASICs. Ответ нейронов на закисление внеклеточной среды был обнаружен более 25 лет назад, но до сих пор остается до конца непонятной физиологическая значимость данного наблюдения [11]. Ключевыми рецепторами внеклеточных протонов являются ионные каналы ASIC (acid-sensing ion channels) (табл. 1). Эти каналы принадлежат к семейству дегенерин/эпителиальных Na⁺ каналов и широко экспрессируются в нервной системе животных. Известно семь изоформ ASIC, кодируемых четырьмя генами ASIC1a, ASIC1b, ASIC1b2, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 и ASIC4 [12]. Данные каналы функционируют как гомо-, так и гетеро-мультимеры. Гомомультимеры ASIC1a, активируясь внеклеточными протонами, проводят ионы Na⁺ и Ca²⁺ [13], ASIC1b проводит ионы Na⁺ и K⁺, тогда как другие формы проводят только ионы Na⁺ [14]. Разные изоформы ASIC обладают различной рНчувствительностью (табл. 1), ASIC1a и ASIC3 активируются при понижении pH ниже 7, ASIC1b – при pH ниже 6.5, ASIC2a – при pH ниже 5 [15].

В настоящее время показано, что ионные каналы ASIC опосредуют большинство физиологических и патологических функций, связанных с ацидозом. Так было показано, что ASIC1a канал опосредует клеточную смерть, вызванную ацидозом при ишемической болезни [12, 13]. Механизм активации ASIC в ишемическом мозге, приводящий к клеточной смерти, довольно сложен и предполагает участие эндогенных аминов и других рНчувствительных белков, что приводит к увеличению внутриклеточной концентрации ионов кальция и клеточной смерти [12]. Также ASIC каналы играют различные роли в патофизиологии боли, ишемических ударах и психиатрических заболеваниях [16]. Экспериментальные данные свидетельствуют о важной роли ASIC каналов в хеморецепции в различных областях мозга. Закисление в области латерального гипоталамуса стимулирует дыхание посредством активации ASIC1a канала на поверхности орексиновых нейронов [17]. Роль ASIC в регуляции дыхания показана также в ней-

ЗНАЧЕНИЕ рН-СЕНСОРОВ В ПОДДЕРЖАНИИ

Таблица 1. Сенсоры рН в нервной системе

		pH _{0.5} /pK _a	Эффект рН	Ссылки
		1	Ионные каналы	
ASICs	ASIC1a	5.8-6.6	Активируется при понижении внеклеточного pH < 7	[15]
	ASIC1b	6.1-6.2	Активируется при понижении внеклеточного pH < 6.5	
	ASIC2a	4.5-4.9	Активируется при понижении внеклеточного pH < 5	
	ASIC3	6.4–6.6	Активируется при понижении внеклеточного р ${ m H}$ < 7	
К _{2Р} каналы	TASK-1	7.3	Ингибируются понижением внеклеточного pH < 8.4	[21]
	TASK-3	6.0-6.6	Ингибируются понижением внеклеточного pH < 7.4	[22, 123]
	TASK-2	8.0-8.3	Ингибируется при понижении внеклеточного pH < 9.1	[23, 124]
	TALK-1	_	Активируется при повышении внеклеточного pH > 7.8 (max выше 10)	[35]
	TALK-2	9.5	Активируется при повышении внеклеточного pH > 7.8 (max выше 10)	[36]
	TREK-1	7.3	Активируется при повышении внеклеточного pH > 6.9	[37]
		6.0	Активируется при понижении внутриклеточного pH < 7.2	[38]
	TREK-2	7.3	Активируется при понижении внеклеточного pH < 8.5	[37]
		-	Активируется при понижении внутриклеточного pH < 7.2	[39]
	TRESK	_	Активируется при повышении внеклеточного pH в диа- пазоне 5.6–9	[40]
		_	Активируется при повышении внутриклеточного pH в диапазоне 5.6—9	
Kir	Kir1.1	6.5-7.2	Ингибируются понижением внутриклеточного рН	[48]
	Kir2.3	6.8-7.4	Ингибируются понижением внеклеточного pH < 7–7.5	[48]
		6.7	Ингибируются понижением внутриклеточного pH < 7	[48]
	Kir2.4	7.14	Активируется при повышении внеклеточного pH > 6 (max 8.5–9)	[125]
	Kir4.1	6.0-6.1	Ингибируются понижением внутриклеточного рН	[48]
	Kir4.2	6.7-7.1	Ингибируются понижением внутриклеточного рН	
	Kir4.1–Kir5.1	6.8–7.5	Ингибируются понижением внутриклеточного рН	
	Kir4.2–Kir5.1	7.6	Ингибируются понижением внутриклеточного рН	
	Kir6.1	7.1	Активируются понижением внутриклеточного рН	[14]
	Kir6.2	7.2	Активируются понижением внутриклеточного рН	[14]
Потен-	Kv1.2	4.9	Активируется при повышении внеклеточного pH > 4	[45, 46, 48]
циал-зави-	Kv1.3	_	Активируется при повышении внеклеточного рН	[44]
симые К+	Kv1.4	6.3/7.5	Активируется при повышении внеклеточного pH > 5.5	[45, 48]
каналы	Kv1.5	6.2-7.2	Активируется при повышении внеклеточного pH > 5.5	[46, 48]
	Kv2.1	<6.2	Активируется при повышении внеклеточного рН	[48]
	Kv11.1	_	Ингибируются понижением внеклеточного рН от 8.5 до 6.5	[47]
TRPs	TRPV1	5.4	Активируются при повышении внеклеточного рН	[126]
	TRPV4	5-5.4	Активируются при повышении внеклеточного рН	[127]
	TRPC4	7.2	Активация при понижении рН ниже 8.0. 6.5–6.0 макси-	[49]
		(актира_	мум активации, ингибирование <6.0–4.2	r
		ция)		
		52		
		(HILFUSURC		
		вание)		

Таблица 1. Продолжение

		pH _{0.5} /pK _a	Эффект рН	Ссылки
	TRPC5	7.3 (активация) 6.0	Активация при понижении pH ниже 8.0, 6.5 – максимум активации, ингибирование <6.5–5.5	[49]
		(ингибиро- вание)		
	TRPC6	5.7	Ингибируется при понижении внеклеточного рН	[49]
	TRPP2	7.5 (активация)	Активируется при повышении pH выше 6.0, максимум активации 9.0, дальнейшее понижение pH до 10.0 инги- бирует канал	[52]
	1	ļ	Ионотропные рецепторы	I
GABA	α1β2γ2 α3β2γ2	7.7	Ингибируется при понижении pH в диапазоне от 8.5 до 6.4	[56]
NMDAR		6.9–7.3	Ингибирование при понижении рН от 8.4 до 6	[65, 66]
P2X	P2X ₁	6.3	Ингибирование при понижении внеклеточного рН	[59]
	P2X ₂	7.1–7.3	Активируется при понижении рН	[59]
	P2X ₃	6.0	Ингибирование при понижении рН	[59]
	P2X ₄	6.8	Ингибирование при понижении рН	[59]
	P2X ₅	-	Ингибирование при понижении pH в диапазоне от 8 до 5.5	[128]
	P2X ₇	6.1	Ингибирование при понижении рН	[59]
	P2X _{2/3}	_	Активируется при рН 6.3, ингибируется при рН 8.3	[59]
	P2X _{2/6}	7.1 (активании)	Активируется при понижении pH от 8 до 6.3, при пони- жении pH ниже 6.3 ингибируется	[60]
	P2X _{1/5}	<u> </u>	Ингибируется при рН выше и ниже 7.3	[59]
	, -	G	-белоксопряженные рецепторы	l
GPCRs	OGR1	7.48	Активируется при понижении внеклеточного pH, макси- мум 6.8–7, при pH < 6.5 ингибирование	[70]
	GPR4	7.55	Активируется при понижении внеклеточного pH, макси- мум 6.8–7, при pH < 6.5 ингибирование	[70]
	TDAG8	7.0-7.1	Активируются при понижении внеклеточного pH, 6.5–6.8 – максимум, ниже 6.5 ингибирование	[72]
	G2A	-	Активируются при понижении внеклеточного pH ниже 7.6	[71]
	I	Pe	цепторные тирозинкиназы (RTK)	I
RTK	IRR	8.4	Активируются при повышении внеклеточного pH выше 7.9	[77]
	ErbB2	8.6	Активируются при повышении внеклеточного рН выше 8	[96]
	c-Met	8.4	Активируются при повышении внеклеточного рН выше 8	[102]
			Другие белки	
Connexins	Cx26	7.2–7.3	Активируется при повышении внеклеточного рН выше 6.6	[112]
Таблица 1.	Окончание			
------------	-----------			
------------	-----------			

		$pH_{0.5}/pK_a$	Эффект рН	Ссылки
	Cx43		Активируется при повышении внеклеточного pH от 7.4 до 8.5	[111]
	Cx45	7.0	Активируется при повышении внутриклеточного pH > 6.4	[115]
	Cx57	7.4	Активируется при повышении внутриклеточного pH > 7.2	[114]
Receptor guanylyl cyclase	Cx50 > Cx46 > > Cx45 > Cx26 > > Cx37 > Cx43 > > Cx40 > Cx32 GCY-14	7.2–6.5	Ингибирование при понижении внутриклеточного pH Активируется в диапазоне pH 8–10.9	[113]
Cl ⁻ channel	SsCl	7.55	Активируется при повышении внеклеточного pH > 6.5	[129]
	pHCl	7.33	Активируется при повышении внеклеточного pH > 6.5	[130]

ронах NTS (nucleus tractus solitarious) [18] и вентролатеральной медуллы (VLM) [19]. Закисление вентролатеральной медуллы крысы путем микроинъекций искусственной спинномозговой жидкости с pH 6.5 стимулировало дыхание, амилорид и PcTx1 ингибировали этот эффект, что предполагает участие гомомерного ASIC1a или гетеромерного ASIC1a/2 каналов в центральной хеморецепции [19].

Two-Pore Domain Potassium Channels (K_{2P} channels). Другим примером ионных каналов, реагирующих на изменение pH, являются двупоровые калиевые каналы TASK, TALK, TREK. В нервной системе обнаруживаются рН-чувствительные каналы TASK-1, TASK-2 и TASK-3. Причем TASK-2 экспрессируется только в некоторых областях ствола головного мозга, включая RTN (retrotrapezoid nucleus) [20]. RTN – это кластер нейронов, которые активируются при гиперкапнии (повышенном содержании СО₂ в крови) и стабилизируют артериальное Р_{СО}, регулируя вентиляцию легких. Для этих каналов токи максимальны при щелочных значениях рН, при уменьшении рН проводимость каналов значительно уменьшается. Было показано, что для TASK-1 при рН 7.7 наблюдается 90% тока от максимально возможного, тогда как при pH 6.7 только 10% [21]. В случае TASK-3 при понижении внеклеточного рН с 7.2 до 6.4 и до 6.0 наблюдалось понижение тока на 74 и 96% соответственно [22]. TASK-2 демонстрирует 90% от максимально возможного тока при рН 8.8 и только 10% при рН 6.5 [23].

Для каналов TASK-1 и TASK-3 был обнаружен остаток гистидина в позиции 98, отвечающий за pH чувствительность канала, он располагается рядом с ионо-проводящей порой. Мутация этого остатка приводит к потере pH чувствительности каналов [22]. Механизм pH чувствительности TASK-2 отличается. В аналогичной позиции канала TASK-2 располагается остаток аспарагина, замена которого на гистидин приводит к парадоксальному уменьшению рН-чувствительности канала. Было показано, что несколько заряженных аминокислотных остатков из петли между первым трансмембранным доменом и доменом, образующим пору, вносят значительный вклад в рН-чувствительность канала [24]. Предполагается, что физиологическая роль каналов TASK заключается в контроле клеточной возбудимости [25]. Было показано, что повышенная экспрессия TASK, в частности, TASK-3 вносит вклад в К⁺ зависимый апоптоз нейронов мозжечка [26]. Апоптоз может быть предотвращен, если клетки культивировать при кислых значениях рН, ингибирующих активность TASK [26]. О физиологической важности TASK-3 свидетельствует также повышенная экспрессия ионного канала в различных видах опухолей человека [27, 28].

Специфичная экспрессия и экспериментальные данные с нокаутными животными указывают на то, что TASK-2 является одним из главных медиаторов респираторной хемочувствительности, способности мозга чувствовать CO_2 и/или pH и в соответствии с этим менять дыхание, регулируя таким образом газовый состав крови и pH [29,

30]. Было показано что ионы HCO₃⁻ могут напрямую регулировать активность хемочувствительных нейронов RTN, предположительно, посредством TASK-2 [31].

TASK-1 и TASK-3 мРНК была обнаружена в нейронах locus coeruleus и raphe nuclei [32]. Недавние исследования указывают на то, что TASK-1 и TASK-3 также вносят вклад в центральную регуляцию дыхания, действуя совместно в восприятии локальных изменений pH в нейронах VLM. Блокирование TASK путем микроинъекции неселективного антагониста TASK bupivacaine (BUP), специфического антагониста TASK-1 anandamide (AEA) или специфического антагониста TASK-3 рутения красного (RR) в VLM увеличивало разрядку диафрагмального нерва (iPND), сокращало время вдоха (Ti) и увеличивало активность дыхательного центра (iPND/Ti). Микроинъекция щелочной искусственной спинномозговой жидкости уменьшала активность дыхательного центра, данный эффект был ингибирован добавлением АЕА [33]. Кроме того, у мышей с двойным нокаутом по генам, кодирующим TASK-1 и TASK-3, наблюдался респираторный фенотип, отличный от фенотипов с одиночными нокаутами TASK-1 и TASK-3. Данный фенотип характеризовался заметно увеличенным дыхательным объемом и аномальным увеличением вентиляции при гипероксии (100% О₂). TASK-1 и TASK-3, по-видимому, выполняют различные специфические задачи в сложных процессах, лежаших в основе хеморецепции и дыхательного контроля [34].

Также рН-чувствительностью обладают каналы TALK-1, TALK-2 (TASK-4). Эти каналы активируются при защелачивании внеклеточной среды в диапазоне pH 7.5–10. Чувствительность к pH ТАLК-1 и ТАLК-2 смещена в щелочную сторону по сравнению с TASK-1, TASK-3, а также TASK-2. Их токи в значительной степени (TALK-1) или почти полностью (TALK-2) ингибируются при физиологическом значении рН 7.4, и максимальная активация достигается выше рН 10 [35, 36]. Ионные каналы TREK-1 и TREK-2 чувствительны к изменениям как внеклеточного, так и внутриклеточного pH. TREK-1 активируется при повышении внеклеточного pH > 6.9, достигая максимума активации при pH около 8. TREK-2 наоборот активируется при понижении pH ниже 8.5, с максимумом активации при рН около 6 [37]. При этом внутриклеточное закисление ниже рН 7.2 вызывает активацию обоих каналов [38, 39].

Каналы TRESK блокируются внеклеточным и внутриклеточным подкислением и активируются внеклеточным и внутриклеточным подщелачиванием среды [40]. Изменения внеклеточного pH от 7.3 до 5.6 и 8.9 приводили к ингибированию (80%) и усилению (120%) токов TRESK соответственно, от активности канала, наблюдаемой при pH 7.3. Такой же эффект наблюдался при изменениях внутриклеточного pH. Изменения pH от 7.3 до 5.6 и 8.9 привели к ингибированию (39%) и усилению (140%) токов TRESK соответственно [40]. TRESK является основным фоновым каналом K_{2P} в нейронах DRG, нокаут гена TRESK показал, что этот канал играет роль в регуляции возбудимости нейронов DRG [14].

Калиевые каналы Kir. Еще одними калиевыми каналами, реагирующими на изменение рН, являются калиевые каналы Kir (Inwardly-rectifying potassium channels). Эти каналы характеризуются тем, что входящий ток ионов калия проходит через них с большей легкостью, чем выходящий. Семейство каналов Kir состоит по крайней мере из 16 различных субъединиц, которые разделяют на семь подсемейств (Kirl.x-Kir7.x). Все Kir каналы состоят из 4 α-субъединиц, образующих гомомерные или гетеромерные каналы, обладающие различными свойствами [41]. Калиевые каналы Kir регулируют различные процессы, включая клеточную возбудимость, сосудистый тонус, сердечный ритм [41]. Кіг2.3 экспрессируется в мозге, главным образом, в переднем мозге и обонятельной луковице. Внеклеточные протоны ингибируют токи Kir2.3, в то же время при щелочном pH 8.5 наблюдалось увеличение входящего тока [42]. Kir2.3 может активироваться также при увеличении внутриклеточного рН в диапазоне от 6 до 7. Калиевый канал Kir 2.4 активируется при повышении внеклеточного pH > 6, достигая максимума при рН 8.5-9. В мозге экспрессируются также чувствительные к pH калиевые каналы Kir1.1, Kir4.1, Kir4.2, Kir5.1, Kir6.1, Kir6.2. Эти каналы высокочувствительны к изменениям внутриклеточного рН в области физиологических значений. Активность калиевых каналов Kir1.1, Kir4.1, Kir4.2 и Kir5.1 ингибируется при понижении внутриклеточного pH. Kir6.1 и Kir6.2 активируются при понижении внутриклеточного рН, достигая максимума активации при рН 6.5–6.8, при дальнейшем понижении pH канал ингибируется [14]. Kir5.1 субъединицы не образуют функциональные гомомерные каналы, но преимущественно гетеромеризуются с Kir4.1 субъединицами в астроцитах, in situ гибридизацией показан высокий уровень экспрессии Kir4.1 и Kir5.1 в RTN. В RTN астроцитах были зарегистрированы рН-чувствительные токи, которые ингибировались при добавлении специфических ингибиторов Kir4.1 и Kir5.1 каналов [43]. Таким образом, гетеромерные Kir4.1–Kir5.1 каналы рассматриваются как возможные кандидаты на роль pH-сенсоров в RTN астроцитах. Так как эти каналы чувствительны к изменениям внутриклеточного рН, предполагается, что эффект наблюдае-

мый в RTN астроцитах опосредован Na⁺/HCO₃⁻ котранспортером [43].

Потенциал-зависимые К⁺ каналы (Кv). Другими pH-чувствительными молекулами в нейронах являются Кv каналы. Каналы Кv, состоящие из субъединиц, содержащих шесть трансмембранных сегментов, регулируются изменениями мембранного потенциала. Инактивация активированного канала Kv1.3 задерживается при снижении внеклеточного pH [44], тогда как инактивацию каналов Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5 и Kv11.1 ускоряет внеклеточный ацидоз [44—47], но чувствительность к изменениям pH широко варьируется среди субъединиц Кv каналов. Kv1.2 и Kv2.1 относительно нечувствителены к ингибированию при понижении внеклеточного pH, с pK 5 и < 6.2 [48]. Напротив, Kv1.4 и Kv1.5 более чувствительны к ингибированию при понижении внеклеточного pH, с pK 6.3 [45] и 6.2—7.2 [48] соответственно. Интересно, что Kv1.4, по-видимому, очень чувствителен к ингибированию при понижении внутриклеточного pH с pK 7.5 [48]. Влияние кислотного pH на токи Kv1.2 зависит от потенциала, чем более положительный потенциал, тем меньше ингибирование. Тогда как влияние кислотного pH на токи Kv1.4 не зависело от напряжения [45].

Роль Ку-каналов в центральной хеморецепции не ясна. То, что эти каналы обладают чувствительностью к изменениям как внутриклеточного, так и внеклеточного pH, делает их возможными мишенями в условиях гиперкапнии. Было показано, что ингибиторы Ку-каналов TEA и 4-аминопиридин уменьшают эффект гиперкапнии на хемочувствительные нейроны области LC и NTS, что предполагает участие Ку-каналов в хеморецепции [48].

TRPs. К изменению концентрации H⁺ могут быть чувствительны ионные каналы TRP (transient receptor potential channels, каналы транзиентного рецепторного потенциала). Выделяют семь семейств TRP каналов: TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP, TRPML и TRPN. Эти каналы широко экспрессируются на плазматической мембране в различных клетках, включая нейроны. Также многообразны внеклеточные стимулы, активирующие TRP-каналы. К рН-чувствительным относятся TRPV1, TRPV4, TRPC4, TRPC5 и TRPC6 каналы. TRPV1 — неселективный катионный канал, который активируется при рН ниже 6 и преимущественно проводит ионы Ca²⁺. По некоторым данным TRPV1 может проводит ионы H⁺, вызывая внутриклеточное закисление, что может активировать другие ионные каналы, чувствительные к внутриклеточному pH [14]. Подобно TRPV1 канал TRPV4 также активируется при понижении pH ниже 6. Каналы TRPC4 и TRPC5 активируются при более физиологических значениях рН от 7.4 до 6.5. При дальнейшем понижении рН ниже 6.5-6.0 наблюдается ингибирование каналов. TRPC6 ингибируется при понижении рН [49]. Исследования указывают на роль каналов TRP в ответе на изменение рН/рСО₂ в глиальных клетках, предполагается активация каналов при понижении внутриклеточного рН [6]. При этом в нейронах locus coeruleus (LC), которые участвуют в регуляции дыхания в ответ на повышение pCO_2 в крови, было показано, что TRPC5 канал активируется внеклеточным и Ca²⁺-зависимым внутриклеточным закислением [50]. Применение специфических ингибиторов TRPC каналов SKF-96365, в присутствии которых LC нейроны не реагировали на изменение pH, свидетельствует о роли каналов TRPC в хеморецепции в LC нейронах [50]. С применением капсаицина специфического агониста TRPV1 был показан незначительный вклад каналов TRPV1 в центральную хеморецепцию [51]. В отличие от ионных каналов TRPV1, TRPV4, TRPC4, TRPC5 и TRPC6 ионный канал TRPP2 активируется щелочным pH.

При экспрессии TRPP2 в HEK293T клетках наблюдалось увеличение токов в диапазоне pH от 8 до 9, дальнейшее повышение pH до 10, уменьшало TRPP2 токи [52]. TRPP2 экспрессируется во многих тканях, включая мозг. Однако роль TRPP2 в центральной хеморецепции остается предметом изучения.

Ионоторопные рецепторы

GABA. Одним из рецепторов, реагирующих на изменение рН, является GABA_A рецептор. GABA_₄ рецептор представляет собой ионотропный рецептор, эндогенный лиганд которого ГАМК (у-аминомасляная кислота) является главным ингибиторным нейротрансмиттером центральной нервной системы. При активации GABA₄ рецепторы селективно проводит ионы Cl-, что приводит к гиперполяризации нейрона и ингибированию синаптической передачи. GABA_A рецепторы состоят из пяти субъединиц. Существование шести α , трех β , трех γ , одной δ , одной ε , одной θ , одной π и трех ρ субъединиц обусловливает многообразие GABA_A рецепторов с различным составом субъединиц, с различной локализацией и с отличающимися фармакологическими свойствами [53]. Однако большинство GABA_A рецепторов состоят из двух α , двух β и одной γ 2 субъединицы. Изменения рН вызывают аллостерические изменения молекулы рецептора, приводящие к изменению лиганд-зависимой активности. Интересно, что в зависимости от состава субъединиц, разные формы рецепторов обладают разной чувствительностью к изменению рН внеклеточной среды. В общих случаях наблюдается уменьшение активности рецептора при кислых значениях рН, тогда как в некоторых случаях этот эффект минимален [54, 55]. По сравнению с контролем при рН 7.3 при повышении рН до 8.4 ток GABA был увеличен в 3 и 2.6 раза в GABA рецепторах $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ и азвруг соответственно. Подкисление внеклеточного рН имело противоположный эффект, при pH 6,4 токи GABA понижались в 2 раза [56].

Прямых доказательств роли GABA рецептора как pH-сенсора в центральной хеморецепции нет. Однако известно, что ГАМК-синтезирующие нейроны ингибируют серотониновые нейроны, которые играют важную роль в хеморецепции pH/CO₂

в области medullary raphe, при участии GABA_A и GABA_B рецепторов. CO₂ ингибирует в свою очередь ГАМК-синтезирующие нейроны, таким образом при изменении pH/CO₂ помимо непосредственной активации серотониновых нейронов отсутствует эффект их ингибирования, что в результате стимулирует дыхание [57].

Р2Х. Пуриноцепторы Р2Х представляют собой АТФ-зависимые ионотропные каналы. При связывании внеклеточного АТФ Р2Х неселективно проводят ионы Na⁺, K⁺, Ca²⁺. Субъединицы Р2Х образуют гомо- или гетеротримеры. На данный момент идентифицированы семь субъединиц Р2Х $(P2X_1 - P2X_7)$. Их мембранная топология характеризуется двумя трансмембранными доменами, между ними располагается очень длинная внеклеточная полипептидная петля, которая состоит из примерно 280 аминокислот и богата цистеином. *N*- и С-концы белка ориентированы внутрь клетки [58]. На изменения рН реагируют Р2Х₁, Р2Х₂, Р2Х₃, P2X₄, P2X₅ и P2X₇ субъединицы [14, 59]. Понижение рН снижает эффективность связывания АТФ гомомультимерных рецепторов P2X₁, P2X₃, P2X₄, Р2Х₅ и Р2Х₇, повышение pH не оказывает никакого эффекта. Напротив, подкисление сенсибилизирует гомомультимерные рецепторы Р2Х₂ к активирующему действию АТФ, тогда как при щелочных значениях рН выше 7.5 эффективность действия агониста на гомомультимерные рецепторы Р2Х₂ снижается [14]. Субъединицы Р2Х специфически экспрессируются в различных частях мозга, встречаются как гомо- так и гетеромультимерные комплексы, которые различаются рН-чувствительными свойствами. Гетеромультимерный комплекс P2X_{2/6} активируется при понижении pH от 8 до 6.3 и ингибируется при дальнейшем понижении рН ниже 6.3 [60]. Гетеромультимерный комплекс P2X_{2/3} также активируется при понижении pH от 8.3 до 6.3 [59]. Комплекс Р2Х_{1/5} ингибируется при рН выше и ниже 7.3 [59]. Высокая экспрессия P2X₂ в областях мозга, отвечающих за респираторную активность, включая preBötC и VRG [61], делают Р2Х₂ вероятным кандидатом на роль рН-сенсора, играющего роль в центральной хеморецепции. Хотя прямых доказательств этого нет, многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о роли пуриновых рецепторов в опосредовании клеточного ответа хемочувствительных респираторных нейронов на увеличение концентраций Н⁺ и СО₂. Увеличение внеклеточной концентрации АТФ в ответ на изменение рН/рСО2 в респираторных областях мозга активирует пуриновые рецепторы и соответствующие сигнальные пути, что в результате стимулирует дыхание [10, 62, 63].

NMDAR. Еще одними рецепторами, реагирующими на изменение внеклеточного pH, являются NMDAR рецепторы (N-methyl-D-aspartate receptors). NMDAR рецепторы участвуют в контроле формирования памяти. пластичности синаптических связей, неправильная работа рецепторов, как гипер-активация, так и гипо-активация связана со многими неврологическими и психиатрическими заболеваниями, включая патологическую боль, эпилепсию, болезнь Альцгеймера, шизофрению, депрессию и слабоумие [64]. NMDAR рецепторы представляют собой большие гетеротетрамерные мембранные комплексы. Различные лиганды и аллостерические соединения, связываясь с большими внеклеточными доменами рецепторов, регулируют активность трансмембранного домена, представляющего собой ионный канал. Активность NMDAR рецепторов сильно зависит от изменения внеклеточного рН. При рН 8.4 рецепторы полностью активированы, тогда как понижение рН до 6 полностью ингибирует рецептор [65–67]. Есть данные, свидетельствующие о том, что значительная часть постсинаптического тока NMDAR зависит от внеклеточного защелачивания, генерируемого Са²⁺-АТФазой плазматической мембраны (РМСА) [68]. Ингибирование NMDAR рецепторов при внеклеточном ацидозе способствует уменьшению повреждений кортикальных нейронов, вызванных токсичным воздействием глутамата [67]. Показано, что астроциты в области продолговатого мозга мыши могут синтезировать, хранить и высвобождать D-серин, агонист NMDAR, в ответ на повышение уровня CO_2 . Введение **D**-серина увеличивало частоту дыхания мышей, блокирование NMDAR ингибировало этот эффект, что свидетельствует о роли NMDAR в центральной хеморецепции [69].

G-белоксопряженные рецепторы

К G-белоксопряженным рецепторам, реагирующим на понижение pH, относятся рецепторы мини-семейства G2A/OGR1, включающего G2A, GPR4, OGR1/GPR68 и TDAG8/GPR65. Первыми G-белоксопряженными рецепторами, реагирующими на изменение рН, были обнаружены рецепторы OGR1 и GPR4. При pH 7.8 рецепторы неактивны, тогда как при рН 6.8 полностью активированы. Однако понижение рН вызывает различные клеточные ответы. При активации OGR1 наблюдается образование инозитол фосфата, тогда как активация GPR4 стимулирует образование сАМР [70]. Рецептор G2A, активируясь внеклеточными протонами, вызывает образование инозитол фосфата [71], в то время как активация TDAG8 приводит к накоплению сАМР [72]. Стоит отметить, что активация рецептора G2A протонами, а также его принадлежность этому минисемейству рецепторов ставится под сомнение некоторыми авторами [73].

Считается, что рецепторы семейства G2A/OGR1 вовлечены в поддержание кислотно-основного гомеостаза. Ранние исследования указывают на важнейшие функции рецепторов в организме. Так была продемонстрирована важная роль OGR1 в костной и мышечной тканях, GPR4 в эндотелиальной ткани сосудов, TDAG8 в иммунной системе [73]. Известно, что OGR1 экспрессируется в нервной системе, однако функция рецептора в мозге не изучена, также как и его способность активироваться протонами [73]. Было показано, что TDAG8 экспрессируется в мозге, а именно в переднем мозге, и активируется при кислых значениях рН. При активации рецептора наблюдается увеличение концентрации сАМР и рСREВ [74]. Недавние исследования показали важнейшую роль GPR4 в мозге. GPR4 экспрессируется в хемосенсорных нейронах RTN (retrotrapezoid nucleus), которые поддерживают кислотно-щелочной баланс в организме, посредством регуляции дыхания. Удаление гена GPR4 приводило к нарушению ацидоз-зависимой активации RTN нейронов и увеличению частоты случаев удушья. Таким образом, GPR4, наряду с упомянутым выше ионным каналом TASK-2, также экспрессирующимся в RTN нейронах, является одним из главных медиаторов респираторной хемочувствительности [30].

Рецепторные тирозинкиназы

IRR. Рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR) является членом минисемейства рецептора инсулина, которое также включает рецептор инсулина (IR) и рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF-IR). Рецепторы минисемейства рецептора инсулина существуют на мембране в виде гомологичных димеров, соединенных дисульфидными связями. При созревании оба мономера подвергаются протеолизу в примембранной зоне внеклеточной части. В результате молекула рецептора состоит из двух пар ковалентно связанных α- и β-субъединиц. Во внеклеточной *N*-концевой части α-субъединицы у всех трех рецепторов находятся два лейцин-богатых домена L1 и L2, между которыми располагается фуринподобный богатый цистеином домен С. Далее следуют три фибронектиновых повтора III типа FnIII-1, FnIII-2 и FnIII-3. С-концевая внутриклеточная часть β-субъединицы содержит каталитический домен, способный фосфорилировать тирозин, что является общим свойством рецепторных тирозинкиназ.

Физиологическая роль рецептора IRR до недавнего времени была неизвестна, так как попытки найти природный лиганд рецептора белковой или пептидной природы были безуспешными [75]. Нами было установлено, что IRR может напрямую активироваться слабощелочной внеклеточной средой pH > 7.9. Активация IRR щелочной средой специфична, дозозависима, а также обусловливается конформационными изменениями во внеклеточной части рецептора при повышении pH внеклеточной среды [76, 77].

Очевидный фундаментальный интерес представляет вопрос, чем определяются столь разительные отличия функций рецепторов IR и IGF-IR, имеющих белковые лиганды, с одной стороны, и IRR, с другой.

Эксперименты с химерными белками, в которых отдельные домены IRR были заменены на гомологичные участки рецепторов IR и IGF-IR [78-80], продемонстрировали важнейшую роль внеклеточных доменов L1C, L2 в pH-чувствительности рецептора. Также была показана роль фибронектиновых доменов в активации рецептора IRR. Замена FnIII-2 и FnIII-3 доменов гомологичными участками IR приводила к значительному снижению или исчезновению рН-чувствительности химерного рецептора [81], а мутации аминокислотных остатков, потенциальных сайтов гликозилирования, на Ala в химерных белках, приводили к частичному восстановлению рН-чувствительности [82]. Предположено что, активация IRR включает два отдельных рН-зависимых центра в эктодомене рецептора, которые действуют совместно, индуцируя конформационные изменения в молекуле IRR, приводящие к автофосфорилированию внутриклеточных киназных доменов рецептора [81].

Функцию IRR как сенсора щелочной внеклеточной среды подтверждают физиологические эксперименты. У мышей с направленной инактивацией гена insrr, кодирующего рецептор IRR, наблюдалось нарушение регуляции кислотно-щелочного равновесия. У мышей, нокаутных по гену insrr, щелочная нагрузка на организм сопровождалась метаболическим алколозом и пониженной секрецией бикарбоната в мочу [77]. Животные дикого типа и с нокаутом гена insrr по-разному реагировали на острый экспериментальный алкалоз, вызванный введением бикарбоната в кровь. Интересно, что у мышей с нокаутом IRR, также как и у мышей дикого типа, наблюдается компенсация алкалоза, судя по снижению рН крови, однако это происходит не вследствие секреции избыточного бикарбоната в мочу, а в результате повышения концентрации СО₂ в крови, что, по-видимому, вызвано замеллением лыхания или ускорением метаболизма [83].

В отличие от своих близких гомологов рецепторов IR и IGF-IR, которые экспрессируются в широком спектре тканей и клеток, экспрессия IRR специфична, рецептор обнаруживается в некоторых органах, в определенных типах клеток. Наибольшее количество IRR было обнаружено в почке. В меньших концентрациях мРНК IRR была обнаружена в мозге, желудке, поджелудочной железе. В нервной системе мРНК IRR обнаружена в сенсорных и симпатических нейронах, где IRR коэкспрессируется с тирозинкиназным рецептором фактора роста нервов (NGF) TrkA [75]. Экспрессия IRR и TrkA появляется на перинатальной стадии развития в базальных нейронах переднего мозга, причем мРНК обоих рецепторов обнаруживается в развивающейся нервной системе только совместно. Также имеются данные об экспрессии IRR в холинергических нейронах переднего мозга, где также наблюдается коэкспрессия с рецептором TrkA [75]. Кроме того, IRR был обнаружен в нейробластомах. Экспрессия IRR значительно коррелировала с благоприятным прогнозом в случае нейробластомы [84].

По данным Allen Brain Atlas (http://mouse.brainmap.org) наибольшая экспрессия IRR наблюдается в области таламуса, а именно в области PVT paraventricular nucleus of thalamus, меньшее количество обнаружено в областях ствола мозга, Area Postrema и область ядра XII пары черепных нервов. Область PVT вносит вклад в регуляцию поведения, стресса, мотивации, настроения, аппетита. Также представлены анатомические данные, которые показывают, что PVT передает информацию от нейронов, участвующих в висцеральной или гомеостатической функции [85, 86]. Area postrema (AP), область продолговатого мозга, является одним из циркумвентрикулярных органов, обеспечивающих связь между центральной нервной системой и кровеносной системой в области, где гемато-энцефалический барьер является наиболее проницаемым. АР обеспечивает передачу информации о химическом составе крови в другие области нервной системы.

Местоположение АР за пределами гематоэнцефалического барьера делает этот участок мозга жизненно важным в управлении автономными функциями центральной нервной системы, АР участвует в вегетативном контроле многих физиологических систем, включая сердечно-сосудистую систему и системы, контролирующие питание и обмен веществ [87]. Известно, что АР отвечает за рвотный рефлекс и образует комплекс с соседней областью NTS, которая участвует в регуляции дыхания и поддержании рН [88]. По данным электронного pecypca (http://www.emouseatlas.org) IRR также обнаружен на эмбриональной стадии развития мыши в большом количестве в ганглиях тройничного нерва (trigeminal V ganglion), языкоглоточного нерва (glossopharyngeal IX ganglion), спиномозгового нерва (dorsal root ganglion) и поджелудочной железе, в меньшем количестве в почечных канальцах. Также экспрессия IRR была показана в нейронах спиномозговых ганглиев взрослых мышей (6-8 недель) с использованием метода РНК-секвенирования отдельных клеток, причем в этих же клетках наблюдается высокий уровень экспрессии рецептора TrkA [89]. С использованием метода RT-PCR (reverse transcription PCR) была показана экспрессия рецептора IRR, а также других членов семейства IR и IGF-IR, в одноклеточных эмбрионах мыши и бластоцистах, что также предполагает роль рецептора в развитии организма [90].

Так как IRR и TrkA располагаются рядом на хромосоме и имеют общие регуляторные элементы, расположенные межлу этими двумя генами. было предположено, что IRR не играет специфической роли в нервной системе, и его присутствие определяется только экспрессией TrkA [91]. Тем не менее, значительные изменения внеклеточного рН в нервной ткани происходят как во время нормального физиологического функционирования, так и при патологических состояниях, таких как эпилепсия, инсульт, диабет и др. Значительный алкалоз в тканях периферической или центральной нервной системы может наблюдаться во время гипогликемии, ишемии или почечной недостаточности. В частности, алкалоз тканей является одним из отличительных признаков повреждения головного мозга, вызванного гипогликемией [92]. Можно предположить, что одной из функций IRR является нейропротекторная передача сигнала, способствующая выживанию клетки, в ответ на острый алкалоз нервных тканей в результате патофизиологических состояний.

У мышей, нокаутных по гену IRR, был обнаружен поведенческий фенотип, заключающийся в дефиците агрессивно-оборонительного поведения животных [93]. Насколько данный фенотип связан с функцией IRR в качестве физиологического сенсора pH, остается предметом изучения.

ErbB2 и с-Met. ErbB2 является онкогенной рецепторной тирозинкиназой, связанной с раком молочной железы. Он является членом минисемейства рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). Минисемейство EGFR состоит из четырех членов ErbB1-4. ErbB2 в настоящее время рассматривается как рецептор-сирота, поскольку сам по себе он не связывает EGF-подобные лиганды и может быть активирован только тогда, когда сверхэкспрессируется в злокачественных клетках или находится в комплексе с ErbB3, другим членом минисемейства EGFR. Как показали структурные исследования, ErbB2 не способен связывать лиганд, поскольку его внеклеточный лиганд-связывающий домен уже находится в конформации, связанной с лигандом, тем самым блокируя доступ любого другого пептидного лиганда в эту область [94]. Активация ErbB2 происходит при нефизиологически высоких уровнях экспрессии (например, в раковых клетках), что приводит к фосфорилированию лиганд-независимого рецептора. Активация ErbB2 наблюдалась в клетках рака мочевого пузыря, легких, желудка, яичников, простаты и молочной железы. Это явление связано с амплификацией гена ErbB2, что приводит к сверхэкспрессии белка ErbB2 на поверхности клетки [95]. Недавние исследования показали, что ErbB2 может быть активирован обработкой внеклеточной слабощелочной средой (pH > 8). Таким образом, был описан новый лиганд-независимый механизм активации рецептора ErbB2 [96]. ErbB2 экспрессируется в нервной ткани в небольшом количестве. ErbB2 экспрессируется в мозжечке [97]. Экспрессия ErbB2 и ErbB3 наблюдается в ганглиях спинного мозга зрелой крысы, тогда как ErbB1 и ErbB4 демонстрировали низкую экспрессию. При повреждении периферического нерва наблюдалось значительное увеличение экспрессии ErbB2 и ErbB3 по сравнению с неповрежденным нервом [98].

Известно, что ErbB рецепторы экспрессируются в Шванновских клетках, и их экспрессия регулируется при повреждениях нервной ткани [99]. Недавние исследования показали, что активация рецептора ErbB2 в Шванновских клетках способствует увеличению регенерации спинномозговых аксонов при повреждениях [100].

Другой активируемой щелочью рецепторной тирозинкиназой является с-Met (Met). Меt был обнаружен в качестве рецептора для фактора роста гепатоцитов (HGF), также известного как фактор рассеяния (SF). Связывание лиганда активирует Met-киназный домен, путем димеризации Metсубъединиц и приводит к аутофосфорилированию. Было показано, что активация сигнального пути Met ведет к широкому спектру клеточных реакций, включая ангиогенез, заживление ран, регенерацию тканей, пролиферацию, выживание, рассеяние, подвижность и инвазию [101]. Используя иммуноаффинную хроматографию с антифосфотирозиновым антителом, было обнаружено фосфорилирование эндогенного Met-рецептора при шелочной обработке в клеточной линии CAKI-1. Активация Met щелочью наблюдается при pH > 8.0 и является дозозависимой. Специфичность ответа Met на щелочь была подтверждена обработкой с ингибитором Met киназы SU11274, а также с помощью нокаута Met-рецептора с использованием система редактирования генома CRISPR/CAS9. Оба подхода полностью блокировали фосфорилирование Met в клетках САКІ-1 в ответ на обработку клеток щелочной средой [102].

Рецептор Меt экспрессирется как в центральной, так и в периферической нервной системе [103, 104]. Рецепторная тирозинкиназа Меt участвует во многих процессах развития нервной системы, включая миграцию клеток, развитие дендритов и аксонов и синаптогенез [105, 106]. Экспрессия Меt была обнаружена на пренатальной стадии развития в стволе мозга: включая субпопуляцию нейронов в черепных ядрах (cranial motor nuclei) (nVII, nA и nXII), подгруппу B6 dorsal raphe, ядре Баррингтона и в небольшом подмножестве нейронов в ядре одиночного тракта (nucleus of sol-

itary tract). В отличие от Met, ни полноразмерная форма, ни известные сплайсированные формы HGF не были обнаружены в пренатальном стволе мозга. Была выявлена экспрессия HGF в тканяхмишенях Met-экспрессирующих нейронов ствола мозга, что позволило предположить, что МЕТ в этих нейронах может активироваться HGF из периферических источников [107]. Также можно предположить лиганд-независимый способ активации рецептора Met в стволе мозга. Вместе эти данные предполагают, что передача сигналов МЕТ может влиять на развитие нейронов, которые участвуют в центральной регуляции желудочно-кишечной функции, движения языка, глотания, речи, стресса и настроения. Исследования долговременных изменений экспрессии мРНК белка HGF и его рецептора Met после повреждения спинного мозга у крыс выявили увеличение экспрессии как HGF, так и Met. Экспрессия мРНК HGF была значительно увеличена через 7 дней после травмы в поврежденном сегменте, а пик был через 7 дней. Экспрессия мРНК Met была повышена через 1 день после повреждения и достигла пика через 14 дней [108].

Изменения экспрессии рецепторов ErbB и Met в поврежденных тканях, по-видимому, играют важную роль в последующей регенерации нервной ткани. Алкалоз тканей, возникающий при некоторых повреждениях мозга может быть фактором, активирующим рецепторы ErbB2 и Met, которые активируют процессы регенерации.

Коннексины

Коннексины – семейство мембранных белков, образующих коннексоны. Субъединица коннексина состоит их четырех трансмембранных доменов, двух внеклеточных петель, одной внутриклеточной петли, при этом оба конца белка ориентированы внутрь клетки. Шесть субъединиц белка образуют коннексон. Коннексоны соседних клеток образуют непрерывный канал (гемиканал), который осуществляет трансмембранный транспорт маленьких молекул, таких как АТР, NAD⁺, глутамат, простагландин E2, глюкоза. В человеческом геноме обнаружена 21 изоформа коннексинов, которые широко экспрессируются во многих тканях организма [109]. Коннексины играют важную роль в развитии и гомеостазе организма [109, 110]. Было обнаружено, что гемиканал, образуемый коннексином Сх43, экспрессируемый в HeLa клетках, активируется щелочной внеклеточной средой при повышении внеклеточного рН от 7.4 до 8.5. Активация канала приводит к притоку ионов Ca²⁺ в клетку [111]. К pH-чувствительному каналу относится также Cx26. При рН 8 канал активен, тогда как понижение рН до 6.5 ингибирует канал [112]. Сх26, наряду с другими коннексинами чувствителен также к изменению

внутриклеточного рН. Внутриклеточное закисление ингибирует каналы, образованные коннексинами Cx50 > Cx46 > Cx45 > Cx26 > Cx37 > Cx43 > > Cx40 > Cx32. Самый чувствительный к изменению pH Cx50 (pK_a 7.2), далее каналы расположены в порядке уменьшения рН-чувствительности, для Сх32 pK₂ 6.5 [113]. Каналы, образованные Сх45 и Сх57 активируются при повышении внутриклеточного рН выше 6.4 и 7.2 соответственно [114, 115]. Высокая экспрессия коннексинов Сх26. Сх32. Сх36, Сх43 в хемосенсорных областях мозга предполагает их участие в центральной хеморецепции [109]. Кроме того, коннексины рН-чувствительных астроцитов могут напрямую взаимодействовать с CO₂. Так в коннексинах 26, 30, 32 (Сх26, Сх30, Сх32) содержится сайт связывания СО₂. При повышении рСО₂ гемиканалы открываются и высвобождают АТФ [116, 117], который в свою очередь активирует хемочувствительные нейроны RTN [9, 10].

Рецепторные гуанилатциклазы

Было обнаружено, что трансмембранная рецепторная гуанилатциклаза GCY-14, экспрессирующаяся в хемосенсорных нейронах C. elegans, чувствует щелочной рН в диапазоне от 8 до 10.9. При активации GCY-14 образуется циклический гуанозинмонофосфат (cGMP), который связывается с сGMP-зависимыми каналами, которые в свою очередь проводят ионы Ca²⁺ внутрь клетки, что приводит к активации нейрона [118]. Рецепторные гуанилатциклазы состоят из большого лиганд-связывающего внеклеточного домена, одного трансмембранного домена, внутриклеточного домена, подобного киназному и С-концевого гуанилатциклазного домена. Сайт-направленным мутагенезом показана роль остатка His174 во внеклеточном домене GCY-14 в pH-чувствительности белка. У животных экспрессируются семь форм мембранных гуанилатциклаз GC-A, GC-B, GC-C, GC-D, GC-E, GC-F и GC-G. Есть данные, что GC-D активируется CO₂ или HCO₃, а GC-G – HCO₃ [119].

Лиганд-зависимые хлоридные каналы

pH-чувствительные Cl[−]-каналы являются членами семейства лиганд-зависимых ионных каналов. Их мембранная топология характеризуется четырьмя трансмембранными доменами и большой внеклеточной *N*-концевой частью. У беспозвоночных известны два pH-чувствительных Cl[−]канала pHCl и SsCl, которые активируются внеклеточным щелочным pH (при повышении pH больше 6.5). Хлоридный канал pHCl экспрессируется в нейронах дрозофилы. При экспрессии pHCl в Xenopus oocytes или клетках насекомых Sf9 наблюдались Cl⁻ токи при изменении pH от нейтральных значений до 9.0, тогда как внеклеточное закисление до pH 5.8 ингибировало эти токи. Хлоридный канал SsCl клеща Sarcoptes scabiei, экспрессированный в Xenopus oocytes также обратимо активировался внеклеточным щелочным pH [120].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках основной догмы гомеостаза считается, что рН крови и внеклеточной среды организма должен быть близким к нейтральным величинам, а отклонения в физиологических условиях минимальными. Непрерывный процесс метаболизма и поступление пищи вызывают сдвиги кислотно-щелочного равновесия и требуют удаления избыточных кислот или оснований. В рамках целостного организма выведение части кислот или оснований в малом объеме невозможно без экстремальных изменений рН выводимых экстракорпоральных жидкостей, в частности почечного фильтрата [121]. Также направленное изменение рН необходимо для осуществления определенных внеклеточных функций, таких как пищеварение. В рамках одной клетки возможны изменения рН в органеллах от кислого (лизосомы) до щелочного (митохондрии). Таким образом, при жестком контроле рН основных жидкостей организма, в отдельных локациях возможны существенные сдвиги кислотно-щелочного равновесия.

На сегодняшний день считается, что в нервной системе поддержание pH в нейтральном диапазоне (pH 7.2–7.6) является абсолютно необходимым для ее нормального функционирования, при этом малые изменения pH влияют на возбудимость нейронов, синаптическую передачу, поглощение нейромедиаторов и межклеточную коммуникацию [2, 3]. Чувствительность к изменению pH среды является особенностью многих мембранных белков, которые играют ключевую роль в нейропередаче. Кроме того, было предположено, что малые градиенты pH могут иметь значение в процессах нейрональной дифференцировки, развития, обучения и памяти [3].

В частности, основной причиной колебаний pH в синапсах является сильное закисление синаптических везикул вакуолярной H⁺-ATФазой, которая обеспечивает энергией процесс загрузки нейротрансмиттеров в синаптические везикулы. Экзоцитоз синаптических везикул приводит к высвобождению протонов в синаптическую щель. Таким образом, синаптическая передача вызывает относительно короткое, но сильное закисление синаптической щели. Повышенная синаптическая/нейрональная активность также может вызвать закисление внеклеточной среды в связи с повышенным клеточным метаболизмом [122]. Известно также, что различные патологические состояния такие как ишемия, воспаления, рак или травмы связаны с понижением внеклеточного pH [3].

Исследования последних лет выявили наличие в нервной системе белковых молекул, являющихся сенсорами существенного изменения pH внеклеточной среды как в кислую (до pH 5), так и щелочную (до pH 9) область. Экспрессию данных белков в нервной системе в рамках современных представлений о контроле кислотно-щелочного баланса объяснить сложно. Не исключено, что в нервной системе возможны локальные изменения pH, как в нормальных, так и патологических условиях, которые в настоящее время являются малоизученными и недооцененными.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ № 19-04-01042, грант РФФИ № 19-04-00815, грант РФФИ № 18-04-01369, грант РФФИ № 17-00-00486 и грант РФФИ № 19-34-90177).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит исследований с использованием людей или животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Tortora G.J., Derrickson B.* // Principles of Anatomy & Physiology. 13th ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2012.
- 2. Chesler M. // Physiol. Rev. 2003. V. 83. P. 1183–1221.
- Obara M., Szeliga M., Albrecht J. // Neurochem. Int. 2008. V. 52. P. 905–919.
- 4. *Nattie E., Li A.* // Compr. Physiol. 2012. V. 2. P. 221–254.
- 5. Guyenet P.G., Bayliss D.A. // Neuron. 2015. V. 87. P. 946–961.
- Hirata Y., Oku Y. // Cell Calcium. 2010. V. 48. P. 124– 132.
- Mulkey D.K., Wenker I.C. // Exp. Physiol. 2011. V. 96. P. 400–406.
- Turovsky E., Theparambil S.M., Kasymov V., Deitmer J.W., Del Arroyo A.G., Ackland G.L., Corneveaux J.J., Allen A.N., Huentelman M.J., Kasparov S., Marina N., Gourine A.V. // J. Neurosci. 2016. V. 36. P. 10750– 10758.
- Gourine A.V., Kasymov V., Marina N., Tang F., Figueiredo M.F., Lane S., Teschemacher A.G., Spyer K.M., Deisseroth K., Kasparov S. // Science. 2010. V. 329. P. 571–575.

- Kasymov V., Larina O., Castaldo C., Marina N., Patrushev M., Kasparov S., Gourine A.V. // J. Neurosci. 2013. V. 33. P. 435–441.
- 11. Kryshtal O.A., Trinus K.F., Dashkin A.N. // Neirofiziologiia. 1982. V. 14. P. 209-211.
- 12. Wang Y.Z., Xu T.L. // Mol. Neurobiol. 2011. V. 44. P. 350–358.
- Xiong Z.G., Zhu X.M., Chu X.P., Minami M., Hey J., Wei W.L., MacDonald J.F., Wemmie J.A., Price M.P., Welsh M.J., Simon R.P. // Cell. 2004. V. 118. P. 687– 698.
- 14. *Holzer P.* // Handb. Exp. Pharmacol. 2009. P. 283–332.
- 15. Wemmie J.A., Taugher R.J., Kreple C.J. // Nat. Rev. Neurosci. 2013. V. 14. P. 461–471.
- Wemmie J.A., Price M.P., Welsh M.J. // Trends Neurosci. 2006. V. 29. P. 578–586.
- Song N., Zhang G., Geng W., Liu Z., Jin W., Li L., Cao Y., Zhu D., Yu J., Shen L. // PLoS One. 2012. V. 7. P. e39982.
- Huda R., Pollema-Mays S.L., Chang Z., Alheid G.F., McCrimmon D.R., Martina M. // J. Physiol. 2012. V. 590. P. 4761–4775.
- 19. Song N., Guan R., Jiang Q., Hassanzadeh C.J., Chu Y., Zhao X., Wang X., Yang D., Du Q., Chu X.P., Shen L. // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 38777.
- Gestreau C., Heitzmann D., Thomas J., Dubreuil V., Bandulik S., Reichold M., Bendahhou S., Pierson P., Sterner C., Peyronnet-Roux J., Benfriha C., Tegtmeier I., Ehnes H., Georgieff M., Lesage F., Brunet J.-F., Goridis C., Warth R., Barhanin J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 2325–2330.
- 21. Duprat F., Lesage F., Fink M., Reyes R., Heurteaux C., Lazdunski M. // EMBO J. 1997. V. 16. P. 5464–5471.
- 22. *Kim Y., Bang H., Kim D.* // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 9340–9347.
- 23. Reyes R., Duprat F., Lesage F., Fink M., Salinas M., Farman N., Lazdunski M. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 30863–30869.
- Morton M.J., Abohamed A., Sivaprasadarao A., Hunter M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 16102–16106.
- 25. Millar J.A., Barratt L., Southan A.P., Page K.M., Fyffe R.E., Robertson B., Mathie A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 3614–3618.
- Lauritzen I., Zanzouri M., Honore E., Duprat F., Ehrengruber M.U., Lazdunski M., Patel A.J. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 32068–32076.
- Pei L., Wiser O., Slavin A., Mu D., Powers S., Jan L.Y., Hoey T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 7803–7807.
- Mu D., Chen L., Zhang X., See L.H., Koch C.M., Yen C., Tong J.J., Spiegel L., Nguyen K.C., Servoss A., Peng Y., Pei L., Marks J.R., Lowe S., Hoey T., Jan L.Y., McCombie W.R., Wigler M.H., Powers S. // Cancer Cell. 2003. V. 3. P. 297–302.
- Wang S., Benamer N., Zanella S., Kumar N.N., Shi Y., Bevengut M., Penton D., Guyenet P.G., Lesage F, Gestreau C., Barhanin J., Bayliss D.A. // J. Neurosci. 2013. V. 33. P. 16033–16044.
- 30. Kumar N.N., Velic A., Soliz J., Shi Y., Li K., Wang S., Weaver J.L., Sen J., Abbott S.B., Lazarenko R.M.,

Ludwig M.G., Perez-Reyes E., Mohebbi N., Bettoni C., Gassmann M., Suply T., Seuwen K., Guyenet P.G., Wagner C.A., Bayliss D.A. // Science. 2015. V. 348. P. 1255–1260.

- Goncalves C.M., Mulkey D.K. // J. Physiol. 2018. V. 596. P. 4033–4042.
- 32. *Enyedi P., Czirjak G. //* Physiol. Rev. 2010. V. 90. P. 559–605.
- Wang X., Guan R., Zhao X., Zhu D., Song N., Shen L. // Front. Cell. Neurosci. 2018. V. 12. P. 285.
- Buehler P.K., Bleiler D., Tegtmeier I., Heitzmann D., Both C., Georgieff M., Lesage F., Warth R., Thomas J. // Respir. Physiol. Neurobiol. 2017. V. 244. P. 17–25.
- Girard C., Duprat F., Terrenoire C., Tinel N., Fosset M., Romey G., Lazdunski M., Lesage F. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. V. 282. P. 249–256.
- Decher N., Maier M., Dittrich W., Gassenhuber J., Bruggemann A., Busch A.E., Steinmeyer K. // FEBS Lett. 2001. V. 492. P. 84–89.
- Sandoz G., Douguet D., Chatelain F., Lazdunski M., Lesage F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 14628–14633.
- Maingret F., Patel A.J., Lesage F., Lazdunski M., Honore E. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 26691–6696.
- 39. Lesage F., Terrenoire C., Romey G., Lazdunski M. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 28398–28405.
- Sano Y., Inamura K., Miyake A., Mochizuki S., Kitada C., Yokoi H., Nozawa K., Okada H., Matsushime H., Furuichi K. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 27406–27412.
- Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I., Kurachi Y. // Physiol. Rev. 2010. V. 90. P. 291–366.
- Coulter K.L., Perier F., Radeke C.M., Vandenberg C.A. // Neuron. 1995. V. 15. P. 1157–1168.
- Wenker I.C., Kreneisz O., Nishiyama A., Mulkey D.K. // J. Neurophysiol. 2010. V. 104. P. 3042–3052.
- Somodi S., Varga Z., Hajdu P., Starkus J.G., Levy D.I., Gaspar R., Panyi G. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2004. V. 287. P. C1067–C1076.
- 45. Ishii K., Nunoki K., Yamagishi T., Okada H., Taira N. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001. V. 296. P. 405–411.
- Steidl J.V., Yool A.J. // Mol. Pharmacol. 1999. V. 55. P. 812–820.
- Jiang M., Dun W., Tseng G.N. // Am. J. Physiol. 1999.
 V. 277. P. H1283–H1292.
- Putnam R.W., Filosa J.A., Ritucci N.A. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2004. V. 287. P. C1493–C1526.
- Semtner M., Schaefer M., Pinkenburg O., Plant T.D. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 33868–33878.
- Cui N., Zhang X., Tadepalli J.S., Yu L., Gai H., Petit J., Pamulapati R.T., Jin X., Jiang C. // J. Neurophysiol. 2011. V. 105. P. 2791–2801.
- Tani M., Kotani S., Hayakawa C., Lin S.T., Irie S., Ikeda K., Kawakami K., Onimaru H. // Pflugers Arch. 2017. V. 469. P. 327–338.
- 52. Shimizu T., Higuchi T., Fujii T., Nilius B., Sakai H. // Pflugers Arch. 2011. V. 461. P. 507–513.
- Olsen R.W., Sieghart W. // Neuropharmacology. 2009. V. 56. P. 141–148.
- 54. Mercik K., Pytel M., Cherubini E., Mozrzymas J.W. // Neuropharmacology. 2006. V. 51. P. 305–314.

- Dietrich C.J., Morad M. // J. Neurosci. 2010. V. 30. P. 16044–16052.
- Huang R.Q., Dillon G.H. // J. Neurophysiol. 1999. V. 82. P. 1233–1243.
- 57. Iceman K.E., Corcoran A.E., Taylor B.E., Harris M.B. // Respir. Physiol. Neurobiol. 2014. V. 203. P. 28–34.
- 58. *Habermacher C., Dunning K., Chataigneau T., Grutter T. //* Neuropharmacology. 2016. V. 104. P. 18–30.
- Khakh B.S., Burnstock G., Kennedy C., King B.F., North R.A., Seguela P., Voigt M., Humphrey P.P. // Pharmacol. Rev. 2001. V. 53. P. 107–118.
- King B.F., Townsend-Nicholson A., Wildman S.S., Thomas T., Spyer K.M., Burnstock G. // J. Neurosci. 2000. V. 20. P. 4871–4877.
- 61. Funk G.D. // Compr. Physiol. 2013. V. 3. P. 331-363.
- 62. Wenker I.C., Sobrinho C.R., Takakura A.C., Moreira T.S., Mulkey D.K. // J. Physiol. 2012. V. 590. P. 2137–2150.
- 63. Sobrinho C.R., Wenker I.C., Poss E.M., Takakura A.C., Moreira T.S., Mulkey D.K. // J. Physiol. 2014. V. 592. P. 1309–1323.
- 64. *Paoletti P., Bellone C., Zhou Q. //* Nat. Rev. Neurosci. 2013. V. 14. P. 383–400.
- 65. *Tang C.M., Dichter M., Morad M. //* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 6445–6449.
- 66. *Traynelis S.F., Cull-Candy S.G.* // Nature. 1990. V. 345. P. 347–350.
- 67. *Giffard R.G., Monyer H., Christine C.W., Choi D.W.* // Brain. Res. 1990. V. 506. P. 339–342.
- Chen H.Y., Chesler M. // J. Neurosci. 2015. V. 35. P. 873–877.
- 69. Beltran-Castillo S., Olivares M.J., Contreras R.A., Zuniga G., Llona I., von Bernhardi R., Eugenin J.L. // Nat. Commun. 2017. V. 8. P. 838.
- Ludwig M.G., Vanek M., Guerini D., Gasser J.A., Jones C.E., Junker U., Hofstetter H., Wolf R.M., Seuwen K. // Nature. 2003. V. 425. P. 93–98.
- Murakami N., Yokomizo T., Okuno T., Shimizu T. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 42484–42491.
- Wang J.Q., Kon J., Mogi C., Tobo M., Damirin A., Sato K., Komachi M., Malchinkhuu E., Murata N., Kimura T., Kuwabara A., Wakamatsu K., Koizumi H., Uede T., Tsujimoto G., Kurose H., Sato T., Harada A., Misawa N., Tomura H., Okajima F. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 45626–45633.
- Seuwen K., Ludwig M.G., Wolf R.M. // J. Recept. Signal. Transduct. Res. 2006. V. 26. P. 599–610.
- McGuire J., Herman J.P., Ghosal S., Eaton K., Sallee F.R., Sah R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. V. 386. P. 420–425.
- 75. Petrenko A.G., Zozulya S.A., Deyev I.E., Eladari D. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1834. P. 2170–2175.
- Deev I.E., Vasilenko K.P., Kurmangaliev E., Serova O.V., Popova N.V., Galagan Y.S., Burova E.B., Zozulya S.A., Nikol'skii N.N., Petrenko A.G. // Dokl. Biochem. Biophys. 2006. V. 408. P. 184–187.
- Deyev I.E., Sohet F., Vassilenko K.P., Serova O.V., Popova N.V., Zozulya S.A., Burova E.B., Houillier P., Rzhevsky D.I., Berchatova A.A., Murashev A.N., Chugunov A.O., Efremov R.G., Nikol'sky N.N., Bertelli E., Eladari D., Petrenko A.G. // Cell Metab. 2011. V. 13. P. 679–689.

- Deyev I.E., Mitrofanova A.V., Zhevlenev E.S., Radionov N., Berchatova A.A., Popova N.V., Serova O.V., Petrenko A.G. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 33884– 33893.
- 79. *Popova N.V., Deyev I.E., Petrenko A.G. //* Dokl. Biochem. Biophys. 2013. V. 450. P. 160–163.
- Deyev I.E., Popova N.V., Petrenko A.G. // Acta Naturae. 2015. V. 7. P. 80–86.
- Deyev I.E., Chachina N.A., Shayahmetova D.M., Serova O.V., Petrenko A.G. // Biochimie. 2015. V. 111. P. 1–9.
- 82. Deyev I.E., Chachina N.A., Zhevlenev E.S., Petrenko A.G. // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. E2461.
- Deyev I.E., Rzhevsky D.I., Berchatova A.A., Serova O.V., Popova N.V., Murashev A.N., Petrenko A.G. // Acta Naturae. 2011. V. 3. P. 114–117.
- Weber A., Huesken C., Bergmann E., Kiess W., Christiansen N.M., Christiansen H. // Clin. Cancer. Res. 2003. V. 9. P. 5683–5692.
- 85. *Kirouac G.J.* // Neurosci. Biobehav. Rev. 2015. V. 56. P. 315–329.
- 86. Hsu D.T., Kirouac G.J., Zubieta J.K., Bhatnagar S. // Front. Behav. Neurosci. 2014. V. 8. P. 73.
- Price C.J., Hoyda T.D., Ferguson A.V. // Neuroscientist. 2008. V. 14. P. 182–194.
- Miller A.D., Leslie R.A. // Front Neuroendocrinol. 1994. V. 15. P. 301–320.
- Usoskin D., Furlan A., Islam S., Abdo H., Lonnerberg P., Lou D., Hjerling-Leffler J., Haeggstrom J., Kharchenko O., Kharchenko P.V., Kharchenko P.V., Linnarsson S., Ernfors P. // Nat. Neurosci. 2015. V. 18. P. 145–153.
- Erickson R.P., Strnatka D. // Mol. Reprod. Dev. 2011. V. 78. P. 552.
- 91. *Ma L., Merennies J., Parada L.F. //* Development. 2000. V. 127. P. 3777–3788.
- 92. Auer R.N. // Metab. Brain. Dis. 2004. V. 19. P. 169–175.
- 93. Зубков Е.А., Морозова А.Ю., Чачина Н.А., Шаяхметова Д.М., Можаев А.А., Деев И.Е., Чехонин В.П., Петренко А.Г. // Журн. высш. нервн. деят. 2017. V. 67. Р. 106–112.
- 94. Lemmon M.A. // Exp. Cell. Res. 2009. V. 315. P. 638– 648.
- Gebhart G., Flamen P., De Vries E.G., Jhaveri K., Wimana Z. // J. Nucl. Med. 2016. V. 57. Suppl. 1. P. 81S–88S.
- Serova O.V., Chachina N.A., Gantsova E.A., Popova N.V., Petrenko A.G., Deyev I.E. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. E1515.
- Ozaki M., Kishigami S., Yano R. // Neurosci. Res. 1998. V. 30. P. 351–354.
- Mizobuchi S., Kanzaki H., Omiya H., Matsuoka Y., Obata N., Kaku R., Nakajima H., Ouchida M., Morita K. // J. Pain. Res. 2013. V. 6. P. 87–94.
- Audisio C., Nicolino S., Scevola A., Tos P., Geuna S., Battiston B., Perroteau I. // Neuroreport. 2008. V. 19. P. 1605–1609.
- 100. Han S.B., Kim H., Lee H., Grove M., Smith G.M., Son Y.J. // J. Neurosci. 2017. V. 37. P. 10955–10970.
- 101. Trusolino L., Bertotti A., Comoglio P.M. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2010. V. 11. P. 834–848.

- 102. Serova O.V., Orsa A.N., Chachina N.A., Petrenko A.G., Deyev I.E. // J. Recept. Signal Transduct. Res. 2019. V. 39. P. 67–72.
- 103. Achim C.L., Katyal S., Wiley C.A., Shiratori M., Wang G., Oshika E., Petersen B.E., Li J.M., Michalopoulos G.K. // Brain Res. Dev. Brain Res. 1997. V. 102. P. 299–303.
- 104. Zheng L.F., Wang R., Yu Q.P., Wang H., Yi X.N., Wang Q.B., Zhang J.W., Zhang G.X., Xu Y.Z. // Neurosignals. 2010. V. 18. P. 49–56.
- 105. Judson M.C., Eagleson K.L., Levitt P. // J. Neurodev. Disord. 2011. V. 3. P. 282–292.
- 106. Peng Y., Huentelman M., Smith C., Qiu S. // Int. Rev. Neurobiol. 2013. V. 113. P. 135–165.
- 107. Wu H.H., Levitt P. // Dev. Neurosci. 2013. V. 35. P. 1-16.
- 108. Shimamura M., Sato N., Sata M., Wakayama K., Ogihara T., Morishita R. // Brain Res. 2007. V. 1151. P. 188– 194.
- 109. Reyes E.P., Cerpa V., Corvalan L., Retamal M.A. // Front Cell. Neurosci. 2014. V. 8. P. 123.
- 110. Giaume C., Leybaert L., Naus C.C., Saez J.C. // Front. Pharmacol. 2013. V. 4. P. 88.
- Schalper K.A., Sanchez H.A., Lee S.C., Altenberg G.A., Nathanson M.H., Saez J.C. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2010. V. 299. P. C1504–C1515.
- 112. Sanchez H.A., Bienkowski R., Slavi N., Srinivas M., Verselis V.K. // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. P. 21519– 21532.
- Peracchia C. // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1662.
 P. 61–80.
- Palacios-Prado N., Sonntag S., Skeberdis V.A., Willecke K., Bukauskas F.F. // J. Physiol. 2009. V. 587. P. 3251–3269.
- 115. Palacios-Prado N., Briggs S.W., Skeberdis V.A., Pranevicius M., Bennett M.V., Bukauskas F.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 9897–9902.
- 116. Meigh L., Greenhalgh S.A., Rodgers T.L., Cann M.J., Roper D.I., Dale N. // Elife. 2013. V. 2. P. e01213.
- 117. Huckstepp R.T., id Bihi R., Eason R., Spyer K.M., Dicke N., Willecke K., Marina N., Gourine A.V., Dale N. // J. Physiol. 2010. V. 588. P. 3901–3920.
- Murayama T., Maruyama I.N. // Commun. Integr. Biol. 2013. V. 6. P. e26633.
- 119. Potter L.R. // Cell. Signal. 2011. V. 23. P. 1921–1926.
- 120. Murayama T., Maruyama I.N. // J. Neurosci. Res. 2015. V. 93. P. 1623–1630.
- 121. Levin L.R., Buck J. // Annu. Rev. Physiol. 2015. V. 77. P. 347–362.
- 122. Sinning A., Hubner C.A. // FEBS Lett. 2013. V. 587. P. 1923–1928.
- 123. Rajan S., Wischmeyer E., Xin Liu G., Preisig-Muller R., Daut J., Karschin A., Derst C. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 16650–16657.
- 124. Cid L.P., Roa-Rojas H.A., Niemeyer M.I., Gonzalez W., Araki M., Araki K., Sepulveda F.V. // Front. Physiol. 2013. V. 4. P. 198.
- 125. Hughes B.A., Kumar G., Yuan Y., Swaminathan A., Yan D., Sharma A., Plumley L., Yang-Feng T.L., Swaroop A. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2000. V. 279. P. C771– C784.

- 126. Tominaga M., Caterina M.J., Malmberg A.B., Rosen T.A., Gilbert H., Skinner K., Raumann B.E., Basbaum A.I., Julius D. // Neuron. 1998. V. 21. P. 531–543.
- 127. Suzuki M., Mizuno A., Kodaira K., Imai M. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 22664–22668.
- 128. Wildman S.S., Brown S.G., Rahman M., Noel C.A., Churchill L., Burnstock G., Unwin R.J., King B.F. // Mol. Pharmacol. 2002. V. 62. P. 957–966.
- 129. Mounsey K.E., Dent J.A., Holt D.C., McCarthy J., Currie B.J., Walton S.F. // Invert. Neurosci. 2007. V. 7. P. 149–156.
- Schnizler K., Saeger B., Pfeffer C., Gerbaulet A., Ebbinghaus-Kintscher U., Methfessel C., Franken E.M., Raming K., Wetzel C.H., Saras A., Pusch, H., Hatt, H., Gisselmann, G. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 16254– 16262.

The Value of pH Sensors in Maintaining Homeostasis of the Nervous System

O. V. Serova^{*, #}, E. A. Gantsova^{*}, I. E. Deyev^{*}, and A. G. Petrenko^{*}

[#]E-mail: oxana.serova@gmail.com

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7, Moscow, 117997, Russia

Maintaining pH homeostasis is vital for all mammalian cells, since hydrogen and hydroxyl ions perform important functions in the regulation of metabolism. Today, it is believed that maintaining the pH in the neutral range (pH 7.2–7.6) in the nervous system is necessary for its normal functioning, while small changes in pH affect the excitability of neurons, synaptic transmission, neurotransmitter transport and intercellular communication. Sensitivity to changes in pH is a feature of many membrane proteins that play a key role in neuro-transmission. Recent studies have revealed the presence in the nervous system of protein molecules, which are sensors of a significant change in the pH of the extracellular environment in both acidic (to pH 5) and alkaline (to pH 9) areas. It has been established that a change in the pH of the extracellular environment causes various cellular responses in which ion channels, ionotropic receptors, G-protein-coupled receptors, connexins and receptor tyrosine kinases are involved. The presence of these proteins in the nervous system suggests that local acid-base balance shifts are one of the key factors regulating neuronal activity. This review describes the properties of neuronal pH-sensitive proteins.

Keywords: acid-base balance, pH in the nervous system, pH sensors, IRR



УДК 547.964.4:577.112.6

ОПТИМИЗАЦИЯ ТВЕРДОФАЗНОГО СИНТЕЗА ИНГРАМОНА – ПЕПТИДНОГО АНТАГОНИСТА МОНОЦИТАРНОГО ХЕМОТАКСИЧЕСКОГО БЕЛКА 1 (МСР-1) ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. М. В. Сидорова^{*, #}, У. С. Дудкина^{*}, Д. В. Авдеев^{*}, М. Е. Палькеева^{*}, А. С. Молокоедов^{*}, М. В. Овчинников^{*}, А. А. Азьмуко^{*}, С. Б. Гречишников^{**}, Е. В. Кудрявцева^{**}, В. Н. Бушуев^{*}, Т. И. Арефьева^{*}

 *ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии" Минздрава РФ, Россия, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а
 **ЗАО "Синтез пептидов", Россия, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а Поступила в релакцию 20.01.2020 г.

После доработки 29.01.2020 г. Принята к публикации 31.01.2020 г.

Оптимизирован способ твердофазного синтеза (TΦC) инграмона H-Asp-His-Leu-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH – пептидного антагониста моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1) человека, обладающего противовоспалительным действием. Изучены побочные продукты TΦC этого пептида с использованием Fmoc-методологии, их структура установлена спектроскопией ¹H-ЯМР и масс-спектрометрией и подтверждена встречным синтезом. Найдены методические приемы, позволяющие минимизировать образование примесей в ходе TΦC инграмона. Разработана воспроизводимая методика получения инграмона, позволяющая свести к минимуму образование побочных продуктов – соответствующих [Asi⁴]-, [*D*-Asp⁴]- и [βAsp⁴]пептидов – в ходе его твердофазного синтеза.

Ключевые слова: моноцитарный хемотаксический белок 1 человека, инграмон, твердофазный синтез, транспептидация, спектроскопия ЯМР

DOI: 10.31857/S0132342320040272

ВВЕДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что 12-членный пептидный фрагмент (65–76) моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1) человека H-Asp-His-Leu-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH является его антагонистом [1, 2]. Этот пептид получил название инграмон¹ (ингибитор гранулоцитов и моноцитов). В серии экспериментальных работ, выполненных на грызунах и приматах, доказана способность этого пептида подавлять миграцию моноцитов и оказывать противовоспалительное действие [3–5], установлено, что инграмон, меченный технецием (^{99m}Tc), накапливается в очаге воспаления [4].

В модели экспериментального рестеноза артерий после ангиопластики ежедневные инъекции инграмона замедляли формирование неоинтимы [6]. Показано, что противовоспалительное действие инграмона реализуется благодаря конкурированию с МСР-1 за связывание с гликозаминогликанами на поверхности клеток и в составе внеклеточного матрикса; т. о. препарат препятствует созданию концентрационного градиента хемокина, необходимого для привлечения моноцитов в очаг воспаления [7, 8]. Результаты доклинического токсикологического исследования показали. что препарат нетоксичен, не обладает мутагенными, тератогенными свойствами, не влияет на репродуктивную функцию, не проявляет аллергизирующих и иммунотоксических свойств. Безопасность инграмона была подтверждена у здоровых добровольцев и в клинических исследованиях, в том числе у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Противовоспалительная ак-

Сокращения: Asi – аспартимид; β Asp – остаток аспарагиновой кислоты с β -карбоксамидной связью; Boc – *трет*бутилоксикарбонил; Bu¹ – *трет*-бутил; 2-CTC – 2-хлортритилхлорид; DBU – 1,8-диазабицикло[5.4.0]-ундец-7-ен; DCM – дихлорметан; DIC – *N*,*N*'-диизопропилкарбодиимид; DIEA – *N*,*N*-диизопропилэтиламин; DMF – диметилформамид; DMSO – диметилсульфоксид; Fmoc – 9флуоренилметилоксикарбонил; HOBt – 1-гидроксибензотриазол; MALDI – матрично активированная десорбция/ ионизация; MC-масс-спектрометрия; MePip – 4-метилпиперидин; NMM – *N*-метилморфолин; TBTU – *N*,*N*,*N*,*N*тетраметил-*O*-(бензотриазол-1-ил)урония тетрафторборат; TFA – трифторуксусная кислота; TIS – триизопропилсилан; Trt – тритил; ИБС – ишемическая болезнь сердца; TФС – твердофазный синтез.

[#] Автор для связи: (тел.: + 7 (495) 414-67-16, факс: +7 (495) 414-67-86, эл. почта: peptide-cardio@yandex.ru).

¹ № регистрации 425414 от 13.12.2010.

тивность инграмона была доказана у пациентов с ИБС, стентированием коронарных артерий: дополнительное к стандартной терапии ежедневное внутривенное введение препарата до и после процедуры ангиопластики препятствовало подъему концентрации в крови белков острой фазы [8, 9].

Данная работа является продолжением наших исследований инграмона и посвящена изучению состава образующихся в ходе его ТФС примесей, поискам путей минимизации побочных процессов и созданию оптимизированной методики его синтеза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение структуры примесей, образующихся при ТФС инграмона

Для разработки схемы ТФС инграмона за основу была принята его Fmoc-методология. Для блокирования функциональных групп боковых цепей аминокислот были выбраны следующие защиты: Вос — для ε -аминогрупп лизина; Ви^{*t*} — для карбоксильных групп аспарагиновой кислоты и гидроксильных групп треонина и Trt – для карбоксамидных функций глутамина и имидазольного кольца гистидина. Автоматический ТФС инграмона был проведен по стандартной программе автоматического пептидного синтезатора "Tribute UV" с использованием раствора 2% 4-MePip/2% DBU/ DMF для отщепления Fmoc-защит и метода урониевых солей (TBTU/NMM) для создания амидных связей. На рис. 1а представлен профиль аналитической ВЭЖХ неочищенного продукта ТФС. Наиболее существенные примеси – соединения (II) и (III) на рис. 1a, были выделены и проанализированы с помощью масс-спектрометрии и ¹Н-ЯМР-спектроскопии. Было установлено, что оба примесных соединения являются продуктами побочных реакций по остатку Asp⁴, вещество, соответствующее пику II, имело корректную для целевого продукта молекулярную массу (1411.8 Да) и, следовательно, являлось либо оптическим, либо стерическим его изомером. На основании данных спектроскопии ¹Н-ЯМР, представленных в табл. 1, можно предполагать, что это соединение является диастереомерным [*D*-Asp⁴]инграмоном, т.к. наиболее заметные изменения наблюдаются у сигнала протона при хиральном α-углеродном атоме остатка Asp⁴: в инграмоне – α -CH (4.58 м.д.), в побочном продукте – при 4.68 м.д. и амидного протона остатка Lys⁵: в инграмоне - NH (7.79 м.д.),в побочном продукте — 8.08 м.д.

Соединение, соответствующее пику III (рис. 1*a*), имело молекулярную массу (1393.5 Да) на 18 Да меньше, чем у целевого инграмона. По всей вероятности, пептид (III) является продуктом дегидратации. В спектре ¹Н-ЯМР этого вещества (см. табл. 1) присутствуют сигналы протонов всех ами-

нокислотных остатков, входящих в состав инграмона. Однако химические слвиги сигналов ряда остатков побочного продукта отличаются от их значений в спектре целевого вещества (I). В первую очередь это относится ко всем сигналам остатков Asp⁴ и Lys⁵. Так, сигналы Asp⁴ в спектре инграмона – α-CH (4.58 м.д.), β-CH₂ (2.52; 2.72 м.д.) и NH (8.43 м.д.). в побочном продукте наблюдаются соответственно при 4.49 для α-СН, 2.68; 3.05 для β-CH₂ и 8.80 м.д. для NH. Столь значительные различия (особенно сигналов протонов при β-углеродном атоме) можно объяснить модификацией боковой цепи остатка аспарагиновой кислоты. Сигналы протонов остатка Lys5 также сильно отличаются: в инграмоне – α -CH (4.25 м.д.), β -CH₂ (1.50; 1.635 м.д.) и NH (7.79 м.д.), в побочном продукте наблюдаются – α -CH (4.49 м.д.), β -CH₂ (1.83; 2.04 м.д.), сигнал амидного протона в спектре вещества (III) отсутствует. Отсутствие сигнала этого протона свидетельствует об образовании циклического продукта с участием α-аминогруппы остатка Lys5. На основании данных масс-спектрометрии и ¹H-ЯМР-спектроскопии было сделано предположение, что соединение (III) представляет собой аспартимид – промежуточный циклический продукт $\alpha \rightarrow \beta$ -перегруппировки амидной связи, образуемой карбоксильной группой остатка Asp⁴. В результате щелочного гидролиза полученного вещества (III) (1% раствором гидроокиси аммония при рН 9.0 в течение 16 ч) получаются 2 продукта (рис. 2*a*), один из которых по ВЭЖХ совпадает с инграмоном, а второй, вероятно, представляет собой побочный изоаспартилпептид ([BAsp⁴]инграмон) (IV). Известно, что при синтезе аспартилпептидов на стадиях отщепления Fmoc-защит действием вторичных аминов происходит образование циклического аспартимида, результатом чего является $\alpha \rightarrow \beta$ -перегруппировка амидной связи с образованием изомерного побочного продукта [10]. Образование аспартимида, катализируемое кислотой или основанием, является одной из наиболее серьезных побочных реакций в ТФС пептидов, содержащих аспарагиновую кислоту, и до сих пор не разработана экономически эффективная стратегия ее подавления [11, 12]. На рис. 3 схематически представлена $\alpha \rightarrow \beta$ -перегруппировка амидной связи, образуемой карбоксильной группой остатка Asp⁴ в последовательности инграмона. Степень протекания транспептидации главным образом определяется природой соседнего с аспарагиновой аминокислотой остатка, но зависит также и от конкретной аминокислотной последовательности пептида. Надо отметить, что последовательность Asp-Lys, судя по литературным данным [12], не является "критической" с точки зрения возможности протекания этой побочной реакции. В обзоре [12] показано, что при использовании Fmoc-методологии наиболее подвержены



Рис. 1. Аналитическая ВЭЖХ (условия 1, см. эксперим. ч.) продуктов синтеза инграмона (**I**): *a* – неочищенный продукт ТФС, полученный с использованием для отщепления Fmoc-защит смеси 2% DBU/ 2% 4-MePip/DMF; *б* – неочищенный продукт, полученный с использованием деблокирующей смеси 25% 4-MePip/DMF/0.1 M HOBt; *в* – искусственная смесь образцов целевого (**I**) и побочных продуктов (**II**)–(**IV**); *е* – пептид (**I**), очищенный с помощью препаративной ВЭЖХ (см. эксперимент. ч.) (условия 1). Детекция при 220 нм.

транспептидации последовательности Asp-Gly и Asp-Asn [12]. Однако мы применяли для деблокирования α-аминогрупп сильное основание – DBU, которое может ускорить побочный процесс образования аспартимида [12, 13].

Следующим этапом работы было подтверждение структуры примесей, образующихся при ТФС инграмона. Для этого был проведен направленный ТФС [D-Asp⁴]инграмона (II) с использованием производного Fmoc-D-Asp(OBu^r)-OH. Также был синтезирован [β Asp⁴]инграмон (**IV**) с использованием соответствующего производного с незамещенной β-карбоксильной группой Fmoc-Asp-OBu^t. Изоаспартилпептид (IV) был необходим для идентификации продуктов гидролиза побочного [Asi⁴]инграмона (III) и ВЭЖХ-анализа продуктов ТФС. Полученные пептиды (II) и (IV) были очищены с использованием ВЭЖХ, их характеристики приведены в табл. 2. Сравнение соединения (II) с примесью, выделенной из пика II реакционной смеси синтеза инграмона, показало их идентичность (данные аналитической ВЭЖХ, ¹H- \mathcal{M} MC). На рис. 1*в* приведен профиль

ВЭЖХ искусственной смеси инграмона (I) и примесей: [*D*-Asp⁴]- (II), [Asi⁴]- (III) и [β Asp⁴]инграмона (IV). Видно, что инграмон (I) и [β Asp⁴]инграмон (IV) имеют одинаковое время удерживания при pH 3.0, а диастереомеры по остатку Asp⁴ – соединения (I) и (II) – удается разделить.

Для анализа качества целевого пептида было очень важно подобрать условия ВЭЖХ, в которых изомерные пептиды с α- и β-амидной связью, образуемой карбоксильной группой остатка Asp⁴, имеют разное время удерживания (делятся). Оказалось, что при повышении значения рН подвижной фазы в ВЭЖХ до 5.95 соединения (I) и (IV) удается разделить (см. рис. 26). Следует отметить, что при рН 5.95 не происходит разделения диастереоизомерных пептидов (I) и (II). Поэтому для анализа качества инграмона необходимо проводить ВЭЖХ при разных значениях рН подвижной фазы. Сравнение продуктов гидролиза [Asi⁴]инграмона с продуктами встречного синтеза пептидов (I) и (IV) подтвердило наше предположение о том, что в ходе ТФС инграмона при деблокировании α-аминогрупп раствором

	Η _δ			0.88; 0.84;								3.77; 3.62	1.52	
он (IV	\mathbf{H}_{γ}			1.63		1.29		2.14	1.02	2.11	1.13	1.90; 1.84	1.36	1.04
инграм	Η _β	2.80; 2.68	3.09; 3.00	1.49	2.66; 2.57	1.65;	1.53	1.73; 1.42	4.09; 4.03	1.88; 1.70	3.83	2.02	1.70	4.14
βAsp ⁴]ı	H_{α}	4.13	4.65	4.31	4.54	4.266		4.31	4.22	4.37	4.36	4.37	4.32	4.18
	H _N	8.16	8.74	8.15	8.365	8.17		8.17	7.78	7.86	8.03	I	8.06	7.65
	Ηδ			0.87; 0.84		1.49						3.72; 3.64		
H (III)	Η			1.56		1.29		2.10	1.02	2.10	1.12	1.93; 1.84	1.36	1.04
нграмо	H_{β}	2.80; 2.70	3.12; 1.98	1.48	3.05; 2.68	2.04;	1.83	1.86; 1.74	4.01	1.84; 1.72	3.84	2.03; 1.85	1.70; 1.51	4.14
[Asi ⁴]n	H_{α}	4.13	4.68	4.28	4.49	4.49		4.27	4.20	4.38	4.37	4.37	4.32	4.18
	H _N	8.18	8.75	8.22	8.80	Ι		8.05	7.87	7.87	8.04	I	8.07	7.65
	Η _δ			0.86; 0.83		1.52						3.72; 3.64	1.52	
4он (II)	Η			1.56		1.29		2.15	1.02	2.10	1.13	1.90; 1.84	1.36	1.04
инграл	H_{β}	2.80; 2.68	3.08; 2.99	1.44	2.68; 2.52	1.68;	1.53	1.92; 1.79	4.01	1.84; 1.78	3.83	2.03	1.71; 1.54	4.14
D-Asp ⁴	H_{α}	4.13	4.66	4.32	4.63	4.30		4.29	4.22	4.375	4.36	4.37	4.32	4.18
	H_N	8.16	8.73	8.15	8.46	8.08		8.27	7.78	7.87	8.08	I	8.05	7.65
	Η _δ			0.87; 0.84		1.52						3.72; 3.62	1.52	
E	Ηγ			1.58		1.28;	1.52	2.14	1.02	2.10	1.13	1.92; 1.84	1.36	1.04
грамон	Ηβ	2.80; 2.68	3.10; 3.02	1.45	2.72; 2.52	1.635;	1.50	1.90; 1.78	4.01	1.87; 1.72	3.84	2.03	1.70; 1.54	4.14
Инл	H_{α}	4.13	4.66	4.31	4.58	4.25		4.31	4.22	4.38	4.37	4.37	4.32	4.18
	H _N	8.16	8.73	8.18	8.43	7.79		8.14	7.81	7.87	8.05	I	8.06	7.65
Остаток		Asp ¹	His ²	Leu ³	Asp ⁴ / D-Asp ⁴ /Asi ⁴ / BAsp ⁴	Lys ⁵	OPE	GIn	Thr	GIn [®]	Thr ⁹	Pro ¹⁰	Lys ¹¹	Thr ¹²

388

Таблица 1. Химические сдвиги (δ, м.д.) сигналов протонов инграмона и побочных продуктов (II)–(IV), образующихся в ходе его ТФС, в DMSO- d_6 при 300 K

СИДОРОВА и др.

2%DBU/2% 4-MePip/DMF происходит $\alpha \rightarrow \beta$ -перегруппировка амидной связи в последовательности Asp⁴-Lys⁵ с образованием циклического аспартимида (III).

Таким образом, были идентифицированы наиболее существенные примеси, образующиеся при ТФС инграмона с использованием Fmoc-методологии, и их структура была подтверждена независимыми физико-химическими методами и встречным синтезом. Следующей задачей была оптимизация методики получения инграмона.

Оптимизация методики синтеза инграмона

Для разработки оптимальной методики было изучено влияние различных факторов на состав неочищенного продукта ТФС. Нами был получен октапептидилполимер H-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Thr(Bu')-Gln(Trt)-Thr(Bu')-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu')-полимер (V), образец которого был полностью деблокирован для оценки его чистоты с помощью ВЭЖХ. Содержание основного вещества в этом продукте составляло не менее 90%. В дальнейшем аликвоты октапептидилполимера (V) были использованы в качестве исходных соединений в серии тестовых синтезов инграмона, в которых меняли реагенты для отщепления Fmoc-группы и способ создания амидной связи.

Из литературы известны различные методические приемы подавления транспептидации: используют объемные, стерически затрудненные защитные группы для β-карбоксильной функции аспарагиновой кислоты; полимерные носители со стерически затрудненными якорными группами; модифицированные реагенты для отщепления Fmoc-защит, сокращают суммарное время воздействия основных реагентов [12, 14]. В первую очередь было изучено влияние состава деблокирующего реагента на качество неочищенного продукта ТФС, результаты этих опытов приведены в табл. 3.

Представленные в табл. 3 данные показывают, что использование сильного основания – DBU – в составе смеси для отщепления Fmoc-защит приводит к образованию более 20% побочного аспартимида, отсутствие DBU в деблокирующем реагенте практически на порядок снижает содержание аспартимида (до 2.67%), а добавка 1-гидроксибензотриазола к 25% раствору 4-метилпиперидина [14] в DMF минимизирует протекание этого побочного процесса (содержание аспартимида (III) в этом случае колеблется от 0.6 до 0.9%). Вариация суммарного времени деблокирования в пределах 40–60 мин в наших экспериментах не отражалось на результатах синтеза.

В серии экспериментов, проводившихся с использованием оптимального деблокирующего реагента, было изучено влияние способа создания



Рис. 2. Аналитическая ВЭЖХ (условия 2, см. эксперимент. ч.): a – продуктов щелочного гидролиза [Asi⁴]инграмона (1% NH₄OH, pH 9.0, 16 ч); δ – искусственной смеси образцов инграмона (I) и [β Asp⁴]инграмона (IV); ϵ – пептид (I), очищенный с помощью препаративной ВЭЖХ (см. эксперимент. часть).

амидных связей и используемого полимерного носителя на качество неочищенного инграмона. Результаты этих опытов приведены в табл. 4 и 5.

Из данных, представленных в табл. 4, следует, что при ступенчатом наращивании пептидной це-





Пептил	Поспеловательность (Мол. масса)	Чистота	ВЭЖХ*, І	R _t (мин)	MC (MALDI) $m/7$	
пентид	последовательность (тюл. масса)	по ВЭЖХ, %	pH 3.0	рН 5.95		
(I)	H-Asp-His-Leu-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr- Pro-Lys-Thr-OH Инграмон (<i>M</i> 1411.52)	99	16.82	17.90	1411.826 $[M + H]^+$ 1433.858 $[M + Na]^+$ 1449.854 $[M + K]^+$	
(II)	H-Asp-His-Leu- <i>D</i>-Asp -Lys-Gln-Thr-Gln-Thr- Pro-Lys-Thr-OH [<i>D</i> -Asp ⁴]Инграмон (<i>M</i> 1411.52)	95	17.35	17 .90	1411.787 $[M + H]^+$ 1433.814 $[M + Na]^+$ 1449.807 $[M + K]^+$	
(III)	H-Asp-His-Leu- Asi -Lys-Gln-Thr-Gln-Thr- Pro-Lys-Thr-OH [Asi ⁴]Инграмон (<i>M</i> 1393.52)	95	18.04	19.72	1393.371 $[M + H]^+$ 1455.334 $[M + Na + K]^+$	
(IV)	H-Asp-His-Leu- Asp(Lys-Gln-Thr-Gln-Thr- Pro-Lys-Thr-OH)-OH [βAsp ⁴]Инграмон (<i>M</i> 1411.52)	96	16.82	17.07	1411.845 [M + H] ⁺ 1433.808 [M + Na] ⁺ 1449.800 [M + K] ⁺	

Таблица 2. Характеристики пептидов

ВЭЖХ*: колонка Kromasil 100-5-С18 (4.6 × 250 мм). Подвижная фаза: буфер А – 0.05 М КН₂РО₄, буфер Б – 70% ацетонитрил, градиент Б в А от 0 до 40% за 40 мин, скорость потока – 1 мл/мин. Детекция пептидов при длине волны 220 нм. Модификации пептидной цепи выделены жирным шрифтом.

Таблица 3. Влияние реагента для отщепления Fmoc-защит на состав неочищенного продукта ТФС инграмона на полимере Ванга

	Время Содержание		Содержание	Содержание примесей по ВЭЖХ, %			
Деблокирующий реагент	деблокиро- вания, мин (Σ*, мин)	Конденсирующий реагент	инграмона (1) в неочищенном продукте по ВЭЖХ**, %	[<i>D</i> -Asp ⁴]инграмон (II)	[Asi ⁴]инграмон (III)		
2% 4-MePip/2% DBU/ DMF	10 (40)	TBTU/NMM	46.80	5.90	21.70		
25% 4-MePip/DMF	15 (60)	DCC/HOBt	77.78	0.68	2.67		
25% 4-MePip/DMF/ 0.1 M HOBt	15 (60)	DCC/HOBt	84.20	0.52	0.60		

* В скобках приведено суммарное время (в ходе 4-х циклов) обработки аспартил-полимера основным деблокирующим реагентом.

** Приведены данные ВЭЖХ на колонке (4.6 × 250 мм) Kromasil 100-5-С18 в условиях 1.

пи лучшие результаты получаются при использовании карбодиимидного метода, применение солей урония в реакциях пептидообразования дает более высокий выход диастереомерного продукта — [*D*-Asp⁴]инграмона (**II**). Однако при 20-кратном увеличении масштаба синтеза даже при использовании смеси DCC/HOBt содержание примеси диастереомерного пептида (**II**) растет. Видимо,

Таблица 4. Влияние способа создания амидной связи на состав неочищенного продукта ТФС инграмона при использовании 25% 4-MePip/DMF/0.1 M HOBt для отщепления Fmoc-защит

Масштаб ТФС,	Конденсирующий	Содержание инграмона (I)	Содержание прим	есей по ВЭЖХ, %
ммоль стартовой аминокислоты	агент	в неочищенном продукте по ВЭЖХ, %	[D-Asp ⁴]инграмон (II)	[Asi ⁴]инграмон (III)
0.5	TBTU/NMM	74.5	0.89	0.72
0.5	DIC/HOBt	84.2	0.52	0.60
9.0	DIC/HOBt	83.7	1.16	0.87

	Содержание	Содержание	Содержание приме		
Полимерный	стартовой	инграмона (I)			Выход*,
носитель	аминокислоты,	в неочищенном	[<i>D</i> -Asp ⁴]инграмон (II)	[Asi ⁴]инграмон (III)	%
	моль/г	продукте по ВЭЖХ, %			
Полимер Ванга	0.50	84.20	0.52	0.60	48.7
2-СТС-полимер	0.46	85.51	0.30	0.32	54.2

Таблица 5. Влияние природы полимерного носителя на состав неочищенного продукта ТФС инграмона в масштабе 0.5 ммоль при использовании смеси 25% 4-MePip/DMF/0.1 М НОВt для отщепления Fmoc-защит и DIC/HOBt-метода для создания амидных связей

* Выходы приведены в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимеру.

это связано с увеличением времени, необходимого для проведения отдельных процедур ТФС при увеличении масштаба синтеза.

Ланные, привеленные в табл. 5. показывают. что при использовании оптимальных деблокирующего и конденсирующего реагентов результаты ТФС инграмона на стандартном полимере Ванга с 4-гидроксиметилфеноксиметильной якорной группой и полимере с объемной 2-хлортритилхлоридной (2-СТС) якорной группой сравнимы с точки зрения содержания целевого пептида (I), однако содержание примесей (II) и (III) в последнем случае почти вдвое меньше. Выход пептида (I) при синтезе на 2-СТС-полимере также несколько выше – 54.2%. При тест-синтезе на полимере Ванга выход пептида (I) составлял 48.7%. Этот результат согласуется с литературными данными [12] о том, что в некоторых синтезах использование 2-СТС-полимера обеспечивало снижение образования побочного аспартимида.

В результате проведенных исследований

– разработана методика ТФС инграмона, согласно которой использование модифицированного реагента для отщепления Fmoc-защит (раствора 25% 4-МеРір/DMF с добавкой 0.1 М HOBt), карбодиимидного способа создания пептидных связей (DIC/HOBt) и полимерного носителя с 2-хлортритилхлоридной якорной группой обеспечивают получение целевого пептида с хорошей чистотой и низким содержанием побочных продуктов транспептидации и рацемизации по остатку Asp⁴ (рис. 1г и 2в);

 идентифицированы примеси родственных инграмону пептидов, образование которых возможно в процессе его ТФС;

 – разработана методика контроля качества продуктов ТФС инграмона, предполагающая обязательное использование при его ВЭЖХ буферов с различными значениями рН.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали производные аминокислот (Novabiochem, ФРГ), DMF, NMM, HOBt, TBTU, TIS, дихлорметан и трифторуксусную кислоту (Fluka, Швейцария). Для ВЭЖХ применяли ацетонитрил фирмы "Carl Roth GmbH" (ФРГ).

Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе Knauer (ФРГ) на колонке (4.6 \times 250 мм) Kromasil 100-5 С18 (Швеция), размер частиц сорбента 5 мкм, размер пор порядка 100А. В качестве элюентов использовали: буфер A – 0.05 M KH₂PO₄, pH 3.0 (условия 1) или 0.05 М КН₂PO₄, pH 5.95 (условия 2): в условиях 1 и 2 буфер Б – 70% ацетонитрил в буфере А, элюцию проводили со скоростью 1 мл/мин в градиенте концентрации буфера Б в буфере А от 0 до 40% за 40 мин. Детекция – при длине волны 220 нм. Препаративную ВЭЖХ пептидов (II)-(IV) осуществляли на колонке Kromasil 100-10-С18 (30 × 250 мм) с размером частиц сорбента 10 мкм. В качестве элюентов использовали буфер A - 0.1% водный раствор TFA, содержащий 3% ацетонитрила, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А. Элюцию проводили от 100% буфера А в градиенте концентрации 0.5%/мин буфера Б со скоростью 20 мл/мин. ВЭЖХ пептида (I) выполняли на колонках Kromasil 100-10-С18 (30 × 250 мм) или (50 × 250 мм) с размером частиц сорбента 10 мкм. В качестве элюентов использовали буфер А – 0.01 М водный раствор ацетата аммония с рН 4.5, содержащий 3% ацетонитрила, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А. Элюцию проводили от 100% буфера А в градиенте концентрации 0.5% мин буфера Б со скоростью 50 мл/мин. Пептиды детектировали при длине волны 220 нм. Фракции, соответствующие целевому веществу, объединяли, концентрировали в вакууме и лиофилизовали.

¹Н-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре WH-500 Bruker 500 МГц (ФРГ) в DMSO- d_6 при 300 K, концентрация пептидов составляла 2— 3 мг/мл, химические сдвиги (δ , м.д.) измеряли относительно тетраметилсилана. Отнесение сигналов к определенным группам протонов аминокислотных остатков проводили с помощью метода дифференциального двойного резонанса. Массспектры регистрировали на масс-спектрометре Bruker Autoflex speed (Bruker Daltonics Inc., ФРГ), оснащенном твердотельным УФ-лазером с λ 355 нм и рефлектроном, в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Для регистрации массспектров MALDI использовали стальную мишень MTP 384 ground steel. Частота облучения 50 Гц, при регистрации масс-спектра суммировались данные, полученные при 10 последовательных облучениях.

Твердофазный синтез пептидов

Автоматический синтез пептидов H-Asp-His-Leu-D-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH (II) H-Asp-His-Leu-Asp(Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Proи Lys-Thr-OH)-OH (IV) проводили на синтезаторе Tribute-UV (Protein Technologies, Inc., США) в масштабе 0.5 ммоль в соответствии с программой однократной конденсации Fmoс-аминокислот. Пептидную цепь наращивали с С-конца по одной аминокислоте, исходя из Fmoc-Thr(Bu^t)-полимера Ванга (Novabiochem, ФРГ), содержащего 0.50 ммоль/г стартовой аминокислоты. Цикл ТФС включал следующие стадии: 1) промывки DMF Fmoc-аминоацил- или пептидилполимера; 2) деблокирование α-аминогрупп 25% 4-MePip/ DMF/0.1 M HOBt (2 × 5 мин), 3) конденсация 0.4 М раствора 4-кратного избытка ацилирующего агента (2.0 ммоль Fmoc-аминокислоты + 2.0 ммоль HOBt + + 2.0 ммоль DIC) в DMF в течение 1 ч: 4) промывки DMF. Пептиды отщепляли от полимерного носителя действием смеси TFA/TIS/ $H_2O(90:5:5v/v)$ в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Полимер отфильтровывали, промывали на фильтре деблокирующей смесью, фильтрат упаривали, продукт осаждали сухим диэтиловым эфиром. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром, DCM, эфиром и высушивали. Пептиды очищали с помощью ВЭЖХ, как описано выше. Выходы пептидов (II) и (IV) составили 48.2 и 45.0% соответственно, в расчете на стартовую аминокислоту. Их характеристики приведены в табл. 1 и 2.

H-Asp-His-Leu-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH (I)

ТФС на полимере Ванга

Синтез пептида (I) проводили в ручном режиме, исходя из 22 г (11.0 ммоль) Fmoc-Thr(Bu^{*t*})-полимера Ванга (содержание стартовой аминокислоты -0.5 ммоль/г).

Получение октапентидилполимера Fmoc-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Thr(Bu^t)-Gln(Trt)-Thr(Bu^t)-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-полимера (V). Цикл ТФС включал следующие стадии: 1) промывки Fmoc-аминоацил-/пептидилполимера DMF; 2) деблокирование α -аминогрупп 25% 4-MePip/DMF (5 + + 10 мин), 3) конденсация с 0.4 М раствором 4-кратного избытка ацилирующего агента (44.0 ммоль Fmoc-аминокислоты + 44.0 ммоль HOBt + 44.0 ммоль DIC) в DMF в течение 1.5 ч; 4) промывки DMF, 5) тест с нингидрином на остаточные аминогруппы [15]. Для оценки качества промежуточного октапептида образец N^α –свободного пептидил-полимера (V) был обработан деблокирующей смесью TFA/TIS/H₂O (90 : 5 : 5 v/v) в течение 1 ч и после осаждения диэтиловым эфиром продукт анализировали ВЭЖХ в условиях 1. Содержание основного вещества в образце составило 91%. Аликвоты пептидилполимера (V), содержание пептида в которых составляло ≈0.5 ммоль. использовали для тест-синтезов инграмона (I), условия и результаты которых представлены в табл. 3-5. Основную часть октапептидилполимера (V) с содержанием пептида ≈9.0 ммоль использовали для получения целевого продукта (I). Цикл ТФС включал следующие стадии: 1) промывки Етосаминоацил-/пептидилполимера DMF; 2) деблокирование α-аминогрупп 25% 4-МеРір/DMF/ 0.1 M HOBt (5 + 10 мин), 3) конденсация 0.4 М раствора 4-кратного избытка ацилирующего агента (36.0 ммоль Fmoc-аминокислоты + 36.0 ммоль HOBt + 36.0 ммоль DIC) в DMF в течение 1.5 ч; 4) промывки DMF, 5) тест с нингидрином на остаточные аминогруппы. После заключительного отщепления Fmoc-группы и промывок пептидилполимер высушивали и деблокировали действием 350 мл смеси TFA/TIS/H₂O (90 : 5 : 5 v/v) в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Полимер отфильтровывали, промывали на фильтре деблокирующей смесью, фильтрат упаривали, продукт осаждали сухим диэтиловым эфиром. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром, DCM, эфиром и высушивали. Пептид (I) очищали с помощью ВЭЖХ, как описано выше.

Получено 7.2 г инграмона-ацетата (выход 46.6% в расчете на стартовую аминокислоту), содержание уксусной кислоты, определенное ВЭЖХ, составило 4.0%, содержание воды, определенное методом К. Фишера, -4.7%. Масс-спектр: найдено m/z 1411.8, вычислено для $C_{59}H_{98}N_{18}O_{22}$ М - 1411.52. Спектр ¹Н-ЯМР см. табл. 1.

ТФС на 2-СТС-полимере

Автоматический синтез пептида (I) проводили на синтезаторе Tribute-UV с использованием полимерного носителя (Iris Biotech, ФРГ) с 2-хлортритилхлоридной (2-СТС) якорной группой, содержащего 1.2 экв. Сl/г 2-СТС-полимера. Для присоединения стартовой аминокислоты [16] к 1.5 г (1.8 ммоль) 2-СТС-полимера прибавляли раствор 1.43 г (3.6 ммоль) Fmoc-Thr(Bu')-OH в 15 мл DCM, в полученную суспензию приливали 1.53 мл (9.0 ммоль) DIEA и перемешивали 30 мин при 25°С, полимер отфильтровывали и промывали DCM 2 × 15 мл, DMF 2 × 15 мл, DCM 2 × 15 мл. Для отщепления остаточного хлора аминоацилполимер обрабатывали 15 мл смеси DCM–MeOH–DIEA (80:15:5 v/v) 2 × 10 мин, промывали DCM 4 × 15 мл, высушивали и сразу использовали. Содержание стартовой аминокислоты, определенное спектрофотометрически, составило 0.46 ммоль Гтос-Thr(Bu^{*t*})/г аминоацилполимера. Т Φ С пептида (I) проводили, исходя из 1.1 г (0.5 ммоль) аминоацилполимера. Цикл ТФС включал те же стадии, что и при получении пептидов (II) и (IV): 1) промывки Fmoc-аминоацил- или пептилилполимера DMF: 2) деблокирование α-аминогрупп 25% 4-MePip/ DMF/0.1 M HOBt (2 × 5 мин), 3) конденсация 0.4 М раствора 4-кратного избытка ацилирующего агента (2.0 ммоль Fmoc-аминокислоты + + 2.0 ммоль HOBt + 2.0 ммоль DIC) в DMF в течение 1 ч; 4) промывки DMF. Пептид отщепляли от полимерного действием смеси носителя TFA/TIS/H₂O (90 : 5 : : 5 v/v) в течение 1.5 ч при комнатной температуре и очищали с помощью ВЭЖХ, как описано выше. Выход пептида (I) составил 54.2% в расчете на стартовую аминокислоту. Масс-спектр: найдено *m/z* 1411.9, вычислено для C₅₉H₉₈N₁₈O₂₂ М – 1411.52. Спектр ¹Н-ЯМР см. табл. 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день доказана способность инграмона подавлять миграцию моноцитов и оказывать противовоспалительное действие как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях (у здоровых добровольцев и больных с ишемической болезнью сердца). Возможность использования этого пептида для терапии сердечно-сосудистых заболеваний диктует необходимость разработки оптимизированных способов его синтеза. Оптимальная методика синтеза инграмона, позволяющая получать этот пептид с низким содержанием родственных примесей, предполагает использование для отщепления Fmoc-защит раствора 25% 4-MePip/DMF с добавкой 0.1 М HOBt, карбодиимидного способа создания пептидных связей и полимерного носителя с 2-хлортритилхлоридной якорной группой. Разработанная методика воспроизводится при масштабировании синтеза инграмона. Эти результаты являются принципиально важными для организации в ФГБУ "НМИЦ кардиологии" Минздрава России экспериментального производства инграмона и его запланированных клинических испытаний.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения России (рег. № НИОКТР АААА-А19-119022290045-1).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Чазов Е.И., Сидорова М.В., Молокоедов А.С. Арефьева Т.И., Кухтина Н.Б., Красникова Т.Л., Беспалова Ж.Д., Бушуев В.Н. Пептид, обладающий способностью ингибировать миграцию моноцитарных клеток, стимулированную белком МСР-1. Патент РФ № 2260598. Заявл. 29.10.2003. Опубл. 20.09.2005. Бюл. № 26.
- Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Арефьева Т.И., Кухтина Н.Б., Красникова Т.Л., Беспалова Ж.Д., Бушуев В.Н. // Биоорганич. химия. 2004. Т. 30. С. 582–593. [Sidorova M.V., Molokoedov A.S., Aref'eva T.I., Kukhtina N.B., Krasnikova T.L., Bespalova Zh.D., Bushuev V.N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2004. V. 30. P. 523–533.]
- Красникова Т.Л., Арефьева Т.И., Мелехов М. Г., Кухтина Н. Б., Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Бушуев В.Н., Беспалова Ж.Д., Чазов Е.И. // ДАН. 2005. Т. 404. С. 551–554.
- Чазов Е.И., Красникова Т.Л., Беспалова Ж.Д., Кухтина Н.Б., Мелехов М.Г., Арефьева Т.И., Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Гвоздик Т.Е., Мартьянов Б.М., Поздеев В.В., Сергиенко В.Б., Бушуева Т.Л. // ДАН. 2006. Т. 411. С. 270–272.
- Chazov E.I., Bespalova J.D., Arefieva T.I., Kukhtina N.B., Sidorova M.V., Provatorov S.I., Krasnikova T.L. // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2007. V. 85. P. 332–340.
- Кухтина Н.Б., Баштрыков П.П., Беспалова Ж.Д., Сидорова М.В., Арефьева Т.И., Соколов В.О., Красникова Т.Л. // Рос. физиолог. журн. им. И.М. Сеченова. 2008. Т.94. С. 27–37. [Kukhtina N.B., Bashtrykov P.P., Bespalova Zh. D., Sidorova M.V., Aref'eva T.I., Sokolov V.O., Krasnikova T.L. // Neurosci. and Behav. Physi. 2009. V. 39. P. 153–159.]
- Красникова Т.Л., Никитин П.И., Ксеневич Т.И., Горшков Б.Г., Орлов А.В., Сидорова М.В., Азьмуко А.А., Арефьева Т.И., Мамочкина Е.Н., Ефремов Е.Е., Беспалова Ж.Д. // ДАН. 2010. Т. 433. С. 559–562.
- Arefieva T.I., Krasnikova T.L., Potekhina A.V., Ruleva N.U., Nikitin P.I., Ksenevich T.I., Gorshkov B.G., Sidorova M.V., Bespalova Zh. D., Kukhtina N. B., Provatorov S.I., Noeva E.A., Chazov E.I. // Inflamm. Res. 2011. V. 60. P. 955–964.
- Потехина А.В., Проваторов С.И., Арефьева Т.И., Кухтина Н.Б., Масенко В.П., Казначеева Е.И., Рулева Н.Ю., Ноева Е.А., Осяева М.К., Сидорова М.В., Беспалова Ж.Д., Красникова Т.Л. // Терапевтический архив. 2010. Т. 82. С. 58–63.
- Lauer J.L. Fields C.G., Fields G.B. // Lett. Peptide Sci. 1994. V. 1. P. 197–205.
- Stathopoulos P., Papas S., Kostidis S., Tsikaris V. // J. Peptide Sci. 2005. V. 11. P. 658–664.
- Subirós-Funosas R., El-Faham A., Albericio F. // Tetrahedron. 2011. V. 67. P. 8585–8593.
- Tickler A.K., Barrow C.J., Wade J.D. // J. Peptide Science. 2001. V. 7. P. 488–494.

- Michels T., Dölling R., Haberkorn U., Mier W. // Org. Lett. 2012. V. 14(20). P. 5218–5221.
- 15. *Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I. //* Anal. Biochem. 1970. V. 34. P. 595–598.
- Barlos K., Gatos D. // Convergent peptide synthesis // Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach / Eds. Chan W.C., White P.D. Oxford Univ. Press, 2001. P. 215–228.

Optimization of the Solid Phase Synthesis of Ingramon – Peptide Antagonist of the Human Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1)

M. V. Sidorova^{*,#}, U. S. Dudkina^{*}, D. V. Avdeev^{*}, M. E. Palkeeva^{*}, A. S. Molokoedov^{*}, M. V. Ovchinnikov^{*}, A. A. Azmuko^{*}, S. B. Grechishnikov^{*}, E. V. Kudryavtseva^{*}, V. N. Bushuev^{*}, and T. I. Arefieva^{*}

[#]*Phone:* + 7(495) 414-67-16; fax: +7(495) 414-67-86; e-mail: peptide-cardio@yandex.ru

*National Cardiology Research Center, Tret'ya Cherepkovskaya ul., 15A, Moscow, 121552 Russia

** "Peptide Synthesis Ltd.", Tret'ya Cherepkovskaya ul., 15A, Moscow, 121552 Russia

The method of solid-phase synthesis (SPS) of an ingramon – H-Asp-His-Leu-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH – peptide antagonist of human monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) with antiinflammatory effect was optimized. By-products of Fmoc – SPS were studied, their structure was established by ¹H-NMR spectroscopy and mass spectrometry and confirmed by counter synthesis. Methodic skills allowing to minimize the formation of impurities during SPS of ingramon were proposed. A reproducible technique for producing ingramon has been developed to minimize the formation of by-products corresponding to [Asi⁴]-, [D-Asp⁴]- and [β -Asp⁴]-peptides during its solid-phase synthesis.

Keywords: human monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), ingramon, solid phase peptide synthesis, aspartimide formation, ${}^{1}H NMR$ spectroscopy



УДК 577.218

ЦИТОСКЕЛЕТНЫЙ БЕЛОК ЗИКСИН МОДУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ Shh СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА В КЛЕТКАХ НЕРВНОЙ ПЛАСТИНКИ ЭМБРИОНОВ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ Xenopus laevis

© 2020 г. Н. Ю. Мартынова^{*, #}, Е. А. Паршина^{*}, Ф. М. Ерошкин^{*}, А. Г. Зарайский^{*}

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997 ГСП, Москва, В:437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

> Поступила в редакцию 19.12.2019 г. После доработки 20.12.2019 г. Принята к публикации 24.12.2019 г.

Ранее, в результате исследования роли цитоскелетного белка зиксина в процессах дифференцировки клеток в зачатке центральной нервной системы (ЦНС) шпорцевой лягушки Xenopus laevis, мы обнаружили его взаимодействие с тремя компонентами сигнального каскада секретируемого фактора Sonic hedgehog (Shh): трансмембранным рецептором Shh – Patched2 (Ptc2), а так же транскрипционными регуляторами Gli1 и Zic1. В настоящей работе мы изучили влияние нокдауна зиксина на экспрессию некоторых ключевых белков Shh-каскада. Методом ОТ-к ПЦР было показано, что подавление трансляции зиксина усиливает ингибирующее действие Shh на экспрессию таких геновмишеней этого каскада, как Pax6, Irx3 и Dbx2, а также влияет на количество транскриптов ряда генов, кодирующих белки, непосредственно обеспечивающих функционирование Shh-каскада: Shh, Gli1, Ptc2 и Zic1. В результате предложена гипотеза о том, что зиксин участвует в регуляции пространственной разметки клеток нервной пластинки за счет ингибирующего влияния на Shh-каскада.

Ключевые слова: зиксин, sonic hedgehog, сигнальный путь, развитие, Gli1, Zic1 **DOI:** 10.31857/S013234232004020X

введение

Зиксин – лим-доменный белок (LIM-domain protein), локализованный преимушественно во внутриклеточной части клеточных контактов, где он регулирует динамику актинового цитоскелета, был впервые идентифицирован в 1991 г [1]. В последнее время зиксин привлекает все большее внимание в связи с его способностью к перемещению в ядро при механических воздействиях и регулировать там генную экспрессию [2]. В связи с этим можно предположить, что зиксин может оказывать модулирующее влияние на функционирование различных сигнальных каскадов, связывающих внешние воздействия на клетку с генной экспрессией. Такое предположение базируется на следующих данных, полученных как в нашей лаборатории, так и в мировой литературе:

— зиксин, благодаря своей локализации в подмембранном пространстве, способен взаимодействовать с трансмембранными рецепторами различных лигандов и влиять на передачу от них сигналов внутрь клетки. Примером, подтверждающим возможность подобного взаимодействия, является связывание зиксина с гомодимерным трансмембранным гликопротеином эндоглином — рецептором III типа для TGF- β (<u>t</u>ransforming growth <u>f</u>actor β) [3], а так же данные, полученные в нашей лаборатории о взаимодействии зиксина с транс-мембранным рецептором фактора Hh — Patched2 (Ptc2) [4];

— как было показано ранее на культуре клеток [5] и в наших недавних работах на клетках нервной пластинки зародышей *Xenopus* для транскрипционных регуляторов Shh-каскада Gli1 и Zic1, зиксин оказывает влияние на генную экспрессию, связывая транскрипционные факторы и изменяя их внутриклеточную локализацию благодаря своей сигнальной последовательности экспорта из ядра (NES – от nuclear export signal] [6, 7];

— предполагается, что зиксин, перемещаясь в ядро, может влиять на транскрипционную активность генов за счет взаимодействия с регуляторными участками ДНК и/или с определенными транскрипционными факторами и их белковыми партнерами, что так же подтверждено как мировыми исследованиями [8] так и данными, полученными нами для транскрипционного репрессора Xanf1 [9, 10].

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (916) 181-16-32; факс: +7 (495) 3368611; эл. почта: martnat61@gmail.com).

В настоящей работе мы изучили на эмбрионах шпорцевой лягушки Xenopus laevis влияние трансляционного нокдауна зиксина, вызванного с помощью инъекций морфолиновых олигонуклеотидов, на экспрессию ряда генов, кодирующих белки, участвующие в функционировании Shhкаскада. В результате было показано, что подавление трансляции мРНК зиксина вызывает ингибирование экспрессии самого Shh, одного из трех основных эффекторов этого каскада, транскрипционного фактора Gli2, а также транскрипционного фактора Zic5, участвующего в формировании нервного гребня [11]. В то же время, наблюдалось усиление транскрипции трансмембранного рецептора Smo и транскрипционного фактора Zic1, образующего тройной комплекса с зиксином и фактором Gli1 и способствующего перемещению этого комплекса в ядро [7]. Кроме этого, показано, что при снижении уровня зиксина происходит усиление ингибирования генов-мишеней Shhкаскада, которые подавляются в ответ на высокие концентрации Shh.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Подавление трансляции эндогенного зиксина морфолиновыми олигонуклеотидами

Для микроинъекций в зародыши использовалось 2 типа морфолиновых олигонуклеотидов, первые блокировали трансляцию его эндогенной мРНК за счет связывания с ее 5' областью в районе инициации трансляции (MO Zyxin), другие связывались с последовательностью мРНК на границе 3 экзона и 3 интрона (5588-5613 н.п.) и нарушали ее сплайсинг (Splice MO). Поскольку ранее применение морфолиновых олигонуклеотидов, блокирующих трансляцию мРНК эндогенного зиксина приводило к ранней гибели зародышей в результате нарушения межклеточной адгезии и дезагрегации клеток [6, 10] в ходе гаструляции, были подобраны концентрации морфолиновых олигонуклеотидов в диапазоне, которые вызывали повреждения в формирующейся нервной трубки (рис. 1а) и достоверно детектируемое уменьшение уровня зиксина (рис. 1δ).

Степень подавления зиксина детектировали при помощи вестерн-блоттинга лизатов зародышей на стадии нейрулы с анти-зиксин поликлональными антителами кролика, полученными ранее [10] (рис. 16'). Как показало дальнейшее сравнение интенсивности полосы эндогенного зиксина на блоте экстрактов из контрольных и опытных эмбрионов, умеренное подавление трансляции зиксина в эмбрионах (в 3.8 раза) происходило в случае инъекций морфолино блокирующего трансляцию в концентрации 0.15–0.3 мМ (4 нанолитра на бластомер). В то же время, морфолино, блокирующие сплайсинг вызывало аналогичное подавление при более высоких концентрациях (0.5-0.8 mM). (рис. 16").

2. Анализ изменений в экспрессии генов-участников и генов-мишеней Shh-каскада в клетках нервной пластинки в ответ на подавление зиксина

Для понимания нашего выбора исследуемых генов приведем краткое описание Shh сигнального каскада. Канонический Shh-каскад запускается секреторным белком Sonic hedgehog (Shh), который синтезируются в виде про-белка мол. весом около 45 кДа, но в процессе секреции проходит стадию автокаталитического расщепления на два фрагмента – N (около 19 кДа) и С (около 25 кДа). Именно N-фрагмент отвечает за все известные на сегодняшний день сигнальные функции hedgehog [12-14]. Канонический сигнальный каскад состоит из трех основных этапов – рецепторного – прием сигнала; этап трансмиссии внутри клетки и активация мишеней каскада транскрипционными факторами в ядре. На первом этапе участниками этого каскада являются два трансмембранных белка: рецепторы Patched (Ptc) и Smoothened (Smo) [15, 16]. В отсутствие молекул Shh во внеклеточном пространстве, Ptc связывает Smo, блокируя внутриклеточную активацию каскада. При появлении же Shh, происходит его связывание с Ptc, что приводит к высвобождению Smo и к активации каскада. На втором этапе трансмиссии сигнала Smo, свободный от взаимодействия с Ptc, вызывает инактивацию внутриклеточного ингибитора каскада – белка Suppressor of Fused (SuF)], что в свою очередь приводит к перемещению в ядро активных форм белков семейства Gli (Gli1, Gli2 и Gli3), которые непосредственно регулируют экспрессию геномных мишеней Shh-каскада [17, 18]. Кроме этого, в передаче сигнала участвуют факторы Zic, которые физически взаимодействует с Gli, облегчая их транспорт в ядро [19, 20]. Регуляция экспрессии, как и репертуар геномных мишеней зависит от "чувствительности" генов транскрипционных факторов Gli к уровню активации каскада [20].

Данный сигнальный каскад играет ключевую роль в разметке дифференцировки клеток в раннем зачатке ЦНС. На стадии нейрулы Shh — экспрессируется вдоль продольной средней линии нервной пластинки и кодируемый им белок-морфоген Shh диффундирует в стороны от этой линии, образуя поперечные градиенты в правой и левой половине пластинки. Профиль градиента морфогена Shh определяет, какие дифференцировки будут на том или ином расстоянии от средней линии [21]. Например, гены Nkx2.2 и Nkx6.1 экспрессируются вблизи средней линии нервной пластинки — в зоне высоких концентраций Shh. В тоже время, ген Рахб экспрессируется, начиная с некоторого расстояния от средней линии, т.е.

МАРТЫНОВА и др.



Рис. 1. Влияние подавления зиксина на Shh каскад. ($a-a^{"}$ подавление трансляции зиксина вызывает дефекты при формировании нервной пластинки и затрудняет смыкание нервной трубки в ходе нейруляции, a - схема эксперимента, a' - дефекты нервной пластинки при подавлении зиксина морфолиновыми олигонуклеотидами в концентрации 0.3 мМ, $a^{"}$ - детекция места попадания инъецированного материала за счет добавления флуоресцин-лизин декстрана (FLD). $\delta-\delta'$ оценка степени подавления трансляции зиксина при помощи морфолиновых олигонуклеотидов, δ – схема эксперимента, d' – вестерн блоттинг с анти-зиксиновыми антителами из лизатов инъецированных зародышей на 14 стадии развития, в качестве контроля использовали анти-тубулиновые моноклональные антитела, δ'' – проверка статистической достоверности подавления зиксина при помощи Zyxin MO и Splice MO. e – схема канонического Shh-каскада с обозначением трех основных этапов – рецепторного, трансмиссии и активация транскрипции с указанием основных участников и мишеней. e –изменение гровня экспрессии генов-участников каскада при по-давление каскада 1 и 2 классов при подавлении зиксина).

там, где концентрация Shh снижается до определенного значения. В зависимости от того, ингибируется или активируется данный гомеобоксный ген высокой концентрацией Shh, мишени этого сигнального каскада подразделяются на два класса. Гены класса I (*Pax6, Irx3, Dbx*) – ингибируются Shh, а гены класса II (*Nkx2.2 и Nkx6.1*) – активируются им [22].

Таким образом, гены, которые были отобраны для исследования делились на гены-участники Shh-каскада: основной морфоген — секретируемый фактор Shh. на рецепторном этапе – трансмембранные белки-рецепторы patched 2 и Smo, на этапе трансмиссии основные эффекторы каскада, гены Gli1,2,3 и факторы Zic1 и Zic5. и на этапе воздействия на геномные мишени мы тестировали гены двух классов: гены 1 класса, ингибируемые высокими концентрациями Shh (*Pax6*, *Dbx*, Irx3) и гены 2 класса, активируемые им (Nkx2, Nkx6, Foxa2). Для анализа подавления экспрессии зиксина инъекции морфолиновых олигонуклеотидов проводили в оба дорсальных бластомера на стадии 8 клеток. Таким образом были получены следующие типы эмбрионов:

1 – контроль (инъекции контрольных МО),

2 — эмбрионы с пониженной концентрацией зиксина за счет инъекций Zyxin MO в концентрации 0.3 мМ,

3 — эмбрионы с пониженной концентрацией зиксина за счет инъекций ZyxinSplice MO в концентрации 0.6 мМ.

Полученные эмбрионы инкубировали до стадии начала формирования нервной пластинки (нейрула) и затем анализировали экспрессию выбранных генов методом ОТ-кПЦР. В результате было установлено, что при подавлении трансляции зиксина достоверно уменьшается количество транскриптов следующих основных участников Shh-каскала: самого фактора Shh. его рецептора Patched (Ptc2) одного из основных транскрипционных эффекторов Shh семейства Gli-транскрипционного фактора Gli2, а также одного из Zic-факторов: Zic5. В то же время, возрастает экспрессия фактора Zic1, способного к взаимодействию с Gli1 и перемещению его в ядро, а так же трансмембранного рецептора Smoothened (Smo), который запускает каскад при высвобождении от Ptc2 (рис. 1в, 1г).

Кроме того были исследованы изменения в экспрессии генов-мишеней Shh-каскада 1 и 2 классов. В результате было выяснено что гены 2 класса, активирующиеся в ответ на Shh-сигнал (Nkx2.2 и Nkx6.1), практически не меняют свою экспрессию в ответ на подавление зиксина. В то же время, гены 1 класса, подавляющиеся при высокой концентрации Shh (Pax6, Dbx, Irx3), реагируют еще более сильным подавлением. То есть влияние зиксина на гены-мишени 1 класса Shh-каскада является отрицательным, поскольку его подавление усиливает ингибирующий эффект Shh на эти гены.

Полученные результаты дополняют полученные нами ранее данные о влиянии зиксина на регуляцию экспрессии генов, вовлеченных в процесс ранней разметки зачатка центральной нервной системы. Ранее при помощи метода гибридизации *in situ* мы показали сильное уменьшение активности генов-мишеней 1 класса, в норме экспрессирующихся в латеральной области нервной трубки (*Pax6, Dbx1, Olig4*). Так же мы наблюдали слабо детектируемые этим методом изменения в зоне экспрессии генов-мишеней 2 класса экспрессирующихся в вентральной области нервной трубки (*Foxa2, Gli1, Ptc2*) [6].

Мы использовали метод ОТ-кПЦР для исследования и получили результаты, которые подтвердили и дополнили данные предыдущих работ. Было подтверждено ингибирующее влияние подавления зиксина на гены-мишени 1 класса-*Dbx1, Pax6, Olig4, Irx3*, которые экспрессируются в презумптивно дорсальной области нервной пластинки, то есть в зоне низких концентраций Shh (рис. 2). Важно, что метод ОТ-кПЦР дает возможность количественно и статистически достоверно оценить степень этого подавления.

Получено подтверждение данных о слабом влиянии зиксина на гены 2 класса (*Foxa2, Nkx2.2, Nkx6.1*), экспрессирующихся в презумтивно вентральнй зоне нервной пластинки, т.е. вблизи ее центральной линии, в зоне высоких концентраций фактора Shh.

Получены новые данные о влиянии зиксина на гены-участники Shh сигнального каскада, в частности, усиление экспрессии мембранного белка Smo и фактора Zic1 и уменьшение количества транскриптов секретируемого фактора Shh и факторов Gli2 и Zic5 в ответ на подавление зиксина.

В настоящее время остается открытым вопрос о физиологической роли взаимодействия зиксина с цитоплазматическим С-концевым доменом трансмембранного рецептора РТС2. Поскольку это взаимодействие эволюционно консервативно и актуально для человека, как мы показали в работе [4] полученные данные о непосредственном взаимодействии этих белков имеют не только научный, так и практический интерес, поскольку существует множество данных о роли мутаций С-концевых доменов Ptc рецепторов в процессах формирования нервной системы и канцерогенезе, при этом механизмы функционирования этих рецепторов изучены пока недостаточно, что открывает возможность для дальнейших исследований в этой области.



Рис. 2. Схема формирования нервной трубки в ходе нейруляции и позиции областей экспрессии генов-мишеней Shh каскада 1 и 2 класса (в рисунке использованы материалы с сайта https://slide-share.ru/slide/2325962.jpeg).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

1. Микроинъекции морфолиновых олигонуклеотидов

Зародышей Xenopus получали в результате оплодотворения in vitro и растворяли оболочки в 2% цистеине при pH 7.8. Инъекции выполняли в бластомеры на 2-клеточной стадии в 0.1× MMR, в один или оба, в зависимости от целей эксперимента, в 4% фиколле и через 2 часа инъецированные яйца переносили в 0.1× MMR для дальнейшей инкубации. Морфолиновые олигонуклеотиды (MO) смешивали с флуоресцеин-лизиндекстраном (FLD, Invitrogen, 40 кДа, 5 мкг/мкл) и микроинъецировали 5–6 нанолитров раствора МО в различных концентрациях. На стадии нейрулы (стадия 14) эксплантаты нейроэктодермы вырезали из эмбрионов, инъецированных Zyxin МО и контрольных МО, и немедленно лизировали в pearentre TrizolH (Ambion) для выделения PHK. 3 × 10 эксплантатов нейроэктодермы получали для каждого эксперимента, всего было проведено три независимых эксперимента.

МО были приобретены у Gene Tools (Филомат, Орегон, США). Последовательности морфолиновых олигонуклеотидов, использованных в работе приведены в табл. 1.

Электрофорез

Образцы анализировали с помощью SDS-PAGE в 10% гелях по методу Laemmli и подвергали электроблоттингу на PVDF-мембрану (Millipore Corp. Inc.). В качестве первичных антител использовали анти-зиксиновые моноспецифичные поликлональные антитела кролика, полученные ранее [10]

Название	Позиция и последовательность морфолиновых олигонуклеотидов
MO Zyxin	Позиция +32+57 мРНК, кодирующая зиксин для обеих псевдоаллелей зиксина у <i>Xenopus laevis</i> : TGAAATGTTGATGGTGAAGGAGGAC
MO Splice	Позиция +953+972 незрелой мРНК, кодирующая зиксин для обеих псевдоаллелей зик- сина у <i>Xenopus laevis</i> : ctcccactactcacaactcaCCTGATG (intron) (exon)
МО контрольные	Вариант MO Zyxin с точечными мутациями TTAACTGTTTAATGTTGAATGAGAAC в качестве негативного контроля

Таблица 1. Последовательности морфолиновых олигонуклеотидов, использованных в работе

и моноклональные антитела к α-тубулину (Sigma). Вторичными антителами были: козий анти-кроличий F (ab') фрагмент антитела, конъюгированный с щелочной фосфатазой (Sigma) и анти-мышиный F (ab') фрагмент антитела, конъюгированный с щелочной фосфатазой (Sigma). Стабилизированный субстрат Western Blue (Promega) использовали для обнаружения антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой.

ОТ-кПЦР

Тотальную РНК из вырезанных на 14 стадии нервных пластинок выделяли с использованием реагента ExtractRNA (Evrogen) в соответствии с протоколом производителя. РНК осаждали по стандартной методике на основе EtOH и очишали с использованием наборов CleanRNA Standard (Evrogen) и растворяли в 20 мкл воды без РНКазы. Для синтеза первой цепи 250 нг суммарной РНК, выделенной из каждого образца, подвергали обратной транскрипции в 20 мкл конечного объема обратной транскриптазой M-MLV в присутствии 10 пмоль олиго-dT праймера в соответствии с рекомендациями производителя (Evrogen) (+ОТ образец). В качестве отрицательного контроля в реакцию не добавляли обратную транскриптазу M-MLV (образец – ОТ). Для реакции кПЦР использовали приготовленную реакционную смесь, фирменное название qPCRmix-HS SYBR в соответствии с инструкциями производителя (Evrogen). Общий объем 25 мкл смеси содержал: 5 мкл 5× qPCRmix-HS SYBR реакционной смеси, 0.2 мкМ праймеров, 10 нг кДНК-матрицы. Использовалась стандартная программа 40 циклов с горячим стартом; температура отжига составляла 59°С, относительное удлинение — 72°С и плавление 95°С — все длилось 25 секунд. Проверку длины фрагментов ДНК и отсутствие неспецифичных продуктов в результате после проведения РСК проводили один раз после первой реакции с использованием данной пары праймеров с использованием электрофореза в агарозном геле. В результате проверки неспецифичных продуктов выявлено не было, фрагменты ДНК соответствовали предполагаемой длине продукта (табл. 2).

2. Статистические методики, использованные для анализа достоверности полученных данных

Для проверки статистической достоверности данные ОТ-кПЦР, полученные от трех независимых экспериментов, были импортированы в Microsoft Excel и проанализированы с использованием метода $\Delta\Delta$ Ct. Для нормировки уровня экспрессии генов в качестве внутреннего контроля использовали уровень экспрессии гена фактора элонгации *EF-1* α и орнитин-декарбоксилазы (*ODC*), уровни экспрессии которых в данных экспериментальных условиях считались неизменными.

Для статистического анализа изменений в экспрессии зиксина на проявленных специфическими антителами PVDF мембранах измеряли площади полосы с молекулярной массой 100 кДа, соттветствующей зиксину или 58 кДа, соответствующей α-тубулину при помощи программного обеспечения ImageJ (NIH, США). Получали численные значения, которые анализировали в программах: Microsoft Excel 2013 (Microsoft corporation, CIIIA): сначала получали численное выражение отношения значений, соответствующих полосе зиксина к значениям, соответствующим референсной полосе (α-тубулин). Далее использовали данные, полученные в более, чем 5-кратном повторении экспреримента для статистического анализа с использованием *t*-критерия Стьюдента в программе Excel.

Критический уровень значимости (*p*) для всех статистических критериев принимали равным 0.05.

Таб.	пица 2.	Последо	вательност	ги олигонук	леотидов	(праймеро	в), и	спользован	ных д	ля а	нализа	экспресси	IИ
иссл	едуемь	іх факторс	ов (с их инд	центификаци	ионными	номерами в	сист	геме PubMe	d-NCB	ЗІ) м	етодом 1	кПЦР с ук	a-
зани	ием дли	ны ампли	фицирова	нного фраги	мента								
			1								1		

Nº	Название гена	Идентификационный номер белка в NCBI	Последовательность праймера	Длина амплификата, н.п. (нуклеотидных пар)
1	Elongation factor 1 alpha, EF-α	NP_001080911	Прямой: GTTCATTTACCGCACAGGTTATCA Обратный: ACACAGGGGGCATATCCAGCA	70
2	Ornithine decarboxylase 1 (ODC)	NP_001080167.1	Прямой: GCCAGTTCTAACAAAGAAACCCA Обратный: TCTACGATACGATCCAGCCCA	93
3	NK2 homeobox 1 (Nkx2)	NP_001079093	Прямой: GCTCTGATTATGGCTCGGCT Обратный: CCTCCCACTTCCCTTTTTG	181
4	Homeobox B (Foxa2)	NP_001165629.1	Прямой: ATGGACAGTCCAACATCAACAGA Обратный: AAACAGAGCCCAGGTGACAAGT	91
5	Sonic hedgehog (Shh)	Q92000	Прямой: AGCAACATCCAACCAGGAGA Обратный: CCACTTTCACCGCCTTCA	73
6	Dbx1	NP_001079210.1	Прямой: CGAAACTCCAAGGAACGGGA Обратный: CCCCGAGGATTTCTTGCTCA	114
7	Gli2	AF109923_1	Прямой: CAACATTGGCGGAGGAAAGC Обратный: TTTGTGGGTATCAAACACTCTCT	239
8	Gli3	NP_001081440.1	Прямой: GGTTGGATTCACAGGGGACT Обратный: CATCATCCCGGTCAGTCACG	191
9	Ptc2	NP_001129638.1	Прямой: GACCCCCGGCTATATGAACG TATTGCCTGGAACATCCTGGT	142
10	Zicl	NP_001083799.1	Прямой: CCTGCAGGCTTGGTAAGAGA Обратный: GCCCGATGAGACATGCAGAT	151
11	Zic5	NP_001079126.1	Прямой: CAAACTCTCACGTGGACTGGA Обратный: GAGAGCAGAGAACACTGGCG	249
12	Smo	NP_001128704.1	Прямой: TGCCCGAATGAAGTACAGAAC Обратный: AAGGTGGCCAGAGTAAAGAAGG	224
13	Irx3	NP_001084204.1	Прямой: GTGGTTGGTCAAAGGCAACTT Обратный: GGTTTATGGGCTACGGGCAT	158
14	Nkx6.1	NP_001093386.1	Прямой: CAAGTCAAGCAGCGCCATAC Обратный: TGAGGCTTTAGCTGTGTCCC	129
15	Gli1	AAC24946	Прямой: CATGAGCCGGAAACAGTGTA Обратный: TGACTTGCATTGTACTGGCCAT	169
16	Olig4	NP_001039180.1	Прямой: GCCAGCATCAGACTATGCCA Обратный: CGTGGTGGTTGTGGCAGATA	

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ № 18-04-00674 а. Эксперименты по иммуноблоттингу проводили в рамках проекта РФФИ № 18-29-07014. Эксперименты по фенотипическим изменениям нервной пластинки в рамках проекта РНФ № 19-14-00098.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит исследований с использованием людей в качестве объектов исследования.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Crawford A.W., Beckerle M.C. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 5847–5853.
- Yoshigi M., Hoffman L.M., Jensen C.C., Yost H.J., Beckerle M.C. // J. Cell. Biol. 2005. V. 171. P. 209–215.
- Conley B.A., Koleva R., Smith J.D., Kacer D., Zhang D., Bernabéu C., Vary C.P. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 27440–27449.
- Мартынова Н.Ю., Ермолина Л.В., Ерошкин Ф.М., Зарайский А.Г. // Биоорг. хим. 2015. Т. 41. С. 744–748. [Martynova N.U., Ermolina L.V., Eroshkin F.M., Zarayskiy A.G. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. V. 41. P. 1–5.]
- Nix D.A., Beckerle M.C. // J. Cell. Biol. 1997. V. 138. P. 1139–1147.
- Martynova N.Y., Ermolina L.V., Ermakova G.V., Eroshkin F.M., Gyoeva F.K., Baturina N.S., Zaraisky A.G. // Dev. Biol. 2013. V. 380. P. 37–48.

- Martynova N.Y., Parshina E.A., Ermolina L.V., Zaraisky A.G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018. V. 504. P. 251–256.
- Sadler I., Crawford A.W., Michelsen J.W., Beckerle M.C. // J. Cell. Biol. 1992. V. 119. P. 1573–1588.
- Мартынова Н.Ю., Ермолина Л.В., Ерошкин Ф.М., Гиоева Ф.К., Зарайский А.Г. // Биоорг. хим. 2008. Т. 38. С. 573–576. [Martynova N.Y., Ermolina L.V., Eroshkin F.M., Gioeva F.K., Zaraisky A.G. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2008. V. 34. P. 513–516.]
- Martynova N.Y., Eroshkin F.M., Ermolina L.V., Ermakova G.V., Korotaeva A.L., Smurova K.M., Zaraisky A.G. // Dev. Dyn. 2008. V. 237. P. 736–749.
- Nakata K., Koyabu Y., Aruga J., Mikoshiba K. // Mech. Dev. 2000. V. 99. P. 83–91.
- Lee J.J., Ekker S.C., von Kessler D.P., Porter J.A., Sun B.I., Beachy P.A. // Science. 1994. V. 266. P. 1528–1537.
- Lai C.J., Ekker S.C., Beachy P.A., Moon R.T. // Development. 1995. V. 121. P. 2349–2360.
- Porter J.A., von Kessler D.P., Ekker S.C., Young K.E., Lee J.J., Moses K. Beachy P.A. // Nature. 1995. V. 374. P. 363–366.
- 15. Chen Y., Struhl G. // Cell. 1996. V. 87. P. 553-563.
- Alcedo J., Ayzenzon M., Von Ohlen T., Noll M., Hooper J.E. // Cell. 1996. V. 86. P. 221–232.
- Skoda A.M., Simovic D., Karin V., Kardum V., Vranic S., Serman L. // Bosn. J. Basic. Med. Sci. 2018. V. 18. P. 8–20.
- Pietrobono S., Gagliardi S., Stecca B. // Front. Genet. 2019. V. 10. P. 556.
- Koyabu Y., Nakata K., Mizugishi K., Aruga J., Mikoshiba K. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 6889–6892.
- Mizugishi K., Aruga J., Nakata K., Mikoshiba K. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 2180–2188.
- 21. Ingham P.W. // Genes Dev. 2001. V. 15. P. 3059-3087.
- 22. Briscoe J., Pierani A., Jessell T.M., Ericson J. // Cell. 2000. V. 101. P. 435–445.

Cytoskeletal Protein Zyxin Modulates the Expression of the Shh Signaling Cascade Target Genes in the Cells of the Neural Plate of the *Xenopus laevis* Embryo

N. U. Martynova*, #, E. A. Parshina*, F. M. Eroshkin*, and A. G. Zaraisky*

 *Phone: +7 (916) 181-16-32; fax: +7 (495) 336-36-22; e-mail: martnat61@gmail.com
 *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7, Moscow, 117997 Russia

Earlier, as a result of studying the role of the zyxin cytoskeletal protein in cell differentiation processes in the primordium of the central nervous system (CNS) of the *Xenopus laevis*, we found its interaction with three components of Shh signaling cascade: the transmembrane receptor – Patched2 (Ptc2), as well as transcriptional regulators Gli1 and Zic1. In the present work, we studied the effect of zyxin knockdown on the expression of some key proteins of the Shh cascade. Using RT-q PCR, it was shown that suppression of zyxin translation enhances the inhibitory effect of Shh on the expression of target genes, such as *Pax6, Irx3*, and *Dbx2*, and also affects the number of transcripts of a number of genes encoding proteins that directly support the functioning of the Shh cascade: *Shh*, *Gli1*, *Ptc2*, and *Zic1*. As a result, a hypothesis was proposed that zyxin is involved in the regulation of the spatial marking of neural plate cells due to the inhibitory effect on the Shh cascade.

Keywords: embryogenesis, differentiation, Sonic Hedgehog (Shh) signaling pathway, Zyxin, Gli1, Zic1



УДК 547,543.253

АНТИРАДИКАЛЬНАЯ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ТИОСЕМИКАРБАЗИДНЫХ И 1,2,4-ТРИАЗОЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРОКСИБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ

© 2020 г. Ж. Б. Сатпаева^{*, **, #}, З. Т. Шульгау^{***}, С. Б. Ахметова^{****}, О. А. Нуркенов^{**}, С. Д. Фазылов^{*, **}, М. Ж. Буркеев^{*}

*Карагандинский государственный университет им. Е.А. Букетова, Казахстан, 100028, Караганда, ул. Университетская, 28 **Институт органического синтеза и углехимии РК, Казахстан, 100008, Караганда, ул. Алиханова, 1 ***РГП на ПХВ "Национальный центр биотехнологии" КН МОН РК, Казахстан, 010000, Нур-Султан, Коргалжынское шоссе, 13/5 ****Карагандинская государственная медакадемия, Казахстан, 100000, Караганда, ул Гоголя, 40 Поступила в редакцию 10.02.2020 г. После доработки 20.02.2020 г. Принята к публикации 22.02.2020 г.

В статье приведены результаты оценки антимикробной и антиоксидантной активности синтезированных биологически активных веществ в сравнении со стандартным антиоксидантом – аскорбиновой кислотой. Антиоксидантную активность изучали по способности взаимодействовать с радикалом – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ, DPPH'). Установлено, что в условиях данной тест-системы выраженную антирадикальную активность проявили образцы 2-(2-гидроксибензоил)-N-фенилгидразинкарботиоамид (1) IC₅₀(DPPH) = 15.5 μ M, для 2-(4-гидроксибензоил)-N-фенилгидразинкарботиоамид (2) IC₅₀(DPPH) оказалось равной 31.7 μ M. Результаты оценки антимикробной активности в отношении грамположительных и грамотрицательных тест-штаммов показали слабую антибактериальную активность.

Ключевые слова: антиоксидант, антирадикальная активность, антимикробная активность, штамм, свободный радикал, тиосемикарбазид, 1,2,4-триазол, ДФПГ **DOI:** 10.31857/S0132342320040235

введение

Производные салициловой кислоты (салицилаты) вошли в клиническую практику с конца XIX века и повсеместно применяются до настоящего времени. Такие производные салициловой кислоты как ацетилсалициловая кислота (аспирин), салицилат натрия, салициланилид, салициламид (САМ), метилсалицилат используются в медицине в качестве анальгетиков (болеутоляющее), антипиретиков (жаропонижающее) и антиагрегантов (антитромботическое), антиоксидантов, антипролиферативных и цитотоксических агентов [1-3], они также показали противоопухолевую активность [4-6]. По последним данным производные салициловой кислоты можно рассматривать как биорегуляторы, которые синтезируются самим организмом и выполняют защитные функции. И это позволяет переосмыслить роль салициловой кислоты в патофизиологии человека и животных.

В соседних положениях бензойного кольца у молекулы салициловой кислоты находится группа OH, как у фенола, и группа COOH — как у бензойной кислоты, которые имеют большие возможности для химической трансформации ее молекулы. Салициловая кислота является природным фенольным гормоном, которая играет важную роль в защите растений от разного рода грибов и патогенных микроорганизмов. Из анализа литературных данных [7, 8] по различным производным салициловой кислоты можно отметить следующую особенность взаимосвязи "структура биологическая активность" в молекулах ее производных:

а) Все замещения по кислотным группам (участки I и II) обеспечивали сохранение жаропонижающих, анальгезирующих, противовоспалительных свойств и появлению новых видов активности ($R' = OCH_3$, OC_3H_7 -i, NH_2 , $NHCH_2CH_2$, COOR) и др. [9–11].

б) Замещения по фенильному кольцу молекулы салициловой кислоты (участок III) — появле-

[#]Автор для связи: (эл. почта: e-mail: satpaeva_zh@mail.ru).

№ пп	Названия веществ	Структурная формула
1	2-(2-Гидроксибензоил)- <i>N</i> -фенилгидразинкарботиоамид (1)	OH CONHNH-C-NH-
2	2-(4-Гидроксибензоил)- <i>N</i> -фенилгидразинкарботиоамид (2)	HO C NHNHC-NH-
3	3-(2-Гидроксифенил)-4-фенил-1 <i>H</i> -1,2,4-триазол-5(4 <i>H</i>)-тион (3)	OH Ph / N-S N-NH
4	3-(4-Гидроксифенил)-4-фенил-1 <i>H</i> -1,2,4-триазол-5(4 <i>H</i>)-тион (4)	HO N N N-NH

Таблица 1. Химические формулы изучаемых биологически активных веществ

нию противотуберкулезных, фунгицидных, противогрибковых, антидепрессантных и др. свойств. При этом во многих препаратах также сохраняется обезболивающее, жаропонижающее свойства исходного субстрата [12–14].

В Новосибирском институте органической химии (НИОХ) им. Н.Н. Ворожцова СО РАН на базе структур осалмида и парацетамола направленным синтезом была получена группа замещенных амидов салициловой кислоты, имеющих в *орто*положении экранирующие *трет*-бутильные заместители и изучены их антиоксидантные свойства [15]. Антиоксидантные свойства изученных веществ авторы объясняют протеканием двух механизмов: взаимодействием с пероксильными радикалами и разрушением гипероксидов с образованием молекулярных продуктов.

Целенаправленный поиск эффективных новых терапевтических агентов на основе салициловой кислоты, отличающихся повышенной биологической активностью в сочетании с низкой токсичностью и менее выраженным побочным действием, по прежнему является актуальной задачей. Перспективным направлением создания новых биоактивных производных салициловой кислоты является синтез "гибридных молекул", сочетающих в своей структуре несколько функциональных групп, независимо или синергически действующих на процесс окисления субстратов в липидной или водной фазе.

Целью настоящей работы является исследование антимикробной и антирадикальной активности тиосемикарбазидных и триазоловых производных *орто-* и *пара-*гидроксибензойных кислот (1–4) на модели 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ), расширение арсенала антиоксидантных средств синтетического происхождения на основе салициловой кислоты, его аналога.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Объекты исследования приведены в табл. 1.

Ранее нами были синтезированы производные салициловой кислоты и его аналога (1-4), имеющего в *пара*-положении гидроксильную группу [16, 17], которые содержат в своей структуре тиоамидную группу, остаток фенильного кольца, а также 1,2,4-триазольные группы. Оценка антирадикальных свойств соединений (1-4) с целью выявления среди них активных антиоксидантов была проведена впервые.

Из табл. 2 мы видим, что из представленных соединений (1–4) только 2-(2-гидроксибензоил)-*N*-фенилгидразинкарботиоамид (1) и 2-(4-гидроксибензоил)-*N*-фенилгидразинкарботиоамид (2) снижают оптическую плотность исходного раствора ДФПГ-радикала более чем на 50%, а значит являются перспективными для дальнейших исследований.

Во второй серии эксперимента изучали способность соединений 1 и 2 взаимодействовать с ДФПГ-радикалом в различных концентрациях (от 2.5 до 50 μ M) (табл. 3).

№	Названия соединения	Оптическая плотность, отн. ед.
1	2-(2-Гидроксибензоил)- <i>N</i> -фенилгидразинкарботиоамид (1)	0.049
2	2-(4-Гидроксибензоил)- <i>N</i> -фенилгидразинкарботиоамид (2)	0.297
3	3-(2-Гидроксифенил)-4-фенил-1 <i>H</i> -1,2,4-триазол-5(4 <i>H</i>)-тион (3)	0.82
4	3-(4-Гидроксифенил)-4-фенил-1 <i>H</i> -1,2,4-триазол-5(4 <i>H</i>)-тион(4)	0.882
	Контроль (раствор ДФПГ без испытуемого образца)	1.038

Таблица 2. Значения оптической плотности раствора 100 μМ ДΦΠГ-радикала после 10-минутной инкубации с испытуемым веществом в финальной концентрации 50 μМ

Таблица 3. Значения оптической плотности раствора 100 μM ДΦΠГ-радикала после 10-минутной инкубации с веществами 1 и 2 в финальных концентрациях в реакционной смеси 50, 25, 20, 15, 10, 5 и 2.5 μM

N⁰	Финальная концентрация веществ 1 и 2 в реакционной смеси, µМ	Оптическая плотность, отн. ед. для 1	Оптическая плотность, отн. ед. для 2
1	50	0.048	0.315
2	25	0.294	0.575
3	20	0.413	0.644
4	15	0.562	0.708
5	10	0.698	0.758
6	5	0.848	0.817
7	2.5	0.929	0.858
	Контроль (раствор ДФПГ без испытуемого образца)	1.038	1.038

Зависимость оптической плотности раствора ДФПГ-радикала от концентрации соединений 1 и 2 представлена на рис. 1.

С помощью построенных калибровочных кривых (рис. 1) определили концентрации 2-(2-гидроксибензоил)-*N*-фенилгидразинкарботиоамида (1) и 2-(4-гидроксибензоил)-*N*-фенилгидразинкарботиоамида (2), способные на 50% снижать оптическую плотность 100 μ M раствора ДФПГ-радикала. Для соединения (1) IC₅₀(DPPH) равна 15.5 μ M, а для соединения (2) IC₅₀(DPPH) оказалось равной 31.7 μ M. В качестве стандартного вещества с антиоксидантным действием использовали аскорбиновую кислоту, для которой мы изучили способность в различных концентрациях (от 2.5 до 50 µM) взаимодействовать с ДФПГ-радикалом (табл. 4). В обзоре Е. Niki [18, 19] аскорбиновая кислота отнесена к водорастворимым антирадикальным соединениям и показана ее возможность взаимодействия со свободными радикалами жирнокислотных компонентов липидов.

С помощью построенной калибровочной кривой (рис. 2) определили концентрацию аскорбиновой кислоты, способную на 50% снижать оптиче-

N⁰	Финальная концентрация аскорбиновой кислоты в реакционной смеси, µМ	Оптическая плотность, отн. ед.	
1	50	0.029	
2	25	0.418	
3	20	0.51	
4	15	0.635	
5	10	0.694	
6	5	0.791	
7	2.5	0.865	
	Контроль (раствор ДФПГ без испытуемого образца)	1.028	

Таблица 4. Значения оптической плотности раствора 100 μМ ДФПГ-радикала после 10-минутной инкубации с аскорбиновой кислотой в финальных концентрациях в реакционной смеси 50, 25, 20, 15, 10, 5 и 2.5 μМ



Рис. 1. Зависимость оптической плотности раствора ДФПГ-радикала от концентрации 2-(2-гидроксибензоил)-*N*-фенил-гидразинкарботиоамид (1) и 2-(4-гидроксибензоил)-*N*-фенил-гидразинкарботиоамид (2).

скую плотность 100 μМ раствора ДФПГ-радикала. Для аскорбиновой кислоты IC₅₀(DPPH) оказалась равной 19.9 μМ.

Оценка антирадикального действия образцов (1–4) в отношении ДФПГ-радикала показала, что в условиях данной тест-системы, наиболее выраженную антирадикальную активность проявили образцы 1 и 2, для которых была определена концентрация, способная на 50% снижать оптическую плотность 100 μ M раствора ДФПГ-радикала. Для 2-(2-гидроксибензоил)-*N*-фенилгидразинкарботиоамид (1) IC₅₀(DPPH) оказалась равной 15.5 μ M, для 2-(4-гидроксибензоил)-*N*-фенилгидразинкарботиоамид (2) IC₅₀(DPPH) оказалось равной 31.7 μ M.

По полученным нами данным IC₅₀(DPPH) (μ M) для референтного образца, в данном случае для аскорбиновой кислоты — 19.9 μ M. Активность образца 2-(2-гидроксибензоил)-*N*-фенилгидразин-карботиоамид (1) IC₅₀(DPPH) = 15.5 μ M, не уступает референтному образцу аскорбиновой кислоте.



Рис. 2. Зависимость оптической плотности раствора ДФПГ-радикала от концентрации аскорбиновой кислоты.

По литературным данным [20] IC₅₀(DPPH) (μ M) для известных антиоксидантов, таких как, глутатион – 49, гидрохинон – 27, тролокс – 28, α -токо-ферол – 28, кверцетин – 8. Таким образом, антирадикальная активность образцов 1 и 2 сопоставима с активностью известных антиоксидантов.

Продолжая исследования по обнаружению среди синтезированных производных веществ с выраженной биологической активностью, были проведены первичные скрининговые испытания соединений (1–4) на антимикробную активность в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis*), грамотрицательных (*Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli*) и к дрожжевому грибку *Candida ablicans* штаммов методом диффузии в агар. Препарат сравнения – гентамицин для бактерий и нистатин для дрожжевого грибка *C. ablicans*.

Антимикробную активность соединений (1–4) оценивали по диаметру зон задержки роста тестштаммов (мм). Диаметр зон задержки роста меньше 10 мм и сплошной рост в чашке оценивали как отсутствие антибактериальной активности, 10– 15 мм – слабая активность, 15–20 мм – умеренно выраженная активность, свыше 20 мм – выраженная. Каждый образец испытывался в трех параллельных опытах [21].

Результаты исследования антимикробной активности образцов приведены в табл. 5.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе был использован ДФПГ фирмы "Sigma Aldrich". Для оценки антирадикальной активности исследуемых образцов (1–4) в тесте с

Соединение	Staphylococcus aureus	Bacillus subtilis	Escherichia coli	Pseudomonas aeruginosa	Candida ablicans
1	18 ± 1	16 ± 1	14 ± 1	12 ± 1	13 ± 1
2	12 ± 1	11 ± 1	10 ± 1	—	12 ± 1
3	13 ± 1	13 ± 1	12 ± 1	—	11 ± 1
4	12 ± 1	14 ± 1	12 ± 1	—	11 ± 1
Гентамицин	26 ± 1	24 ± 1	23 ± 1	24 ± 1	—
Нистатин	_	_	_	_	22 ± 1

Таблица 5. Антимикробная активность образцов (1-4)

ДФПГ-радикалом использовали метанольный раствор ДФПГ (100 µМ). Для отбора веществ с выраженной антирадикальной активностью смешивали 2 мл 100 µМ метанольного раствора ДФПГ с 20 мкл исследуемого объекта, растворенного в метаноле в концентрации 5 µМ. Таким образом, финальная концентрация испытуемого вещества в реакционной смеси составила 50 µМ. Через 10 минут после добавления раствора испытуемого соединения к раствору ДФПГ-радикала измеряли снижение оптической плотности при 515 нм. Для веществ, способных снижать оптическую плотность более чем на 50%, проводили тест на взаимодействие с ДФПГ-радикалом в финальных концентрациях исследуемых веществ 50, 25, 20, 15, 10, 5 и 2.5 µМ. После чего определяли концентрацию испытуемого вещества, способную на 50% снижать оптическую плотность IC₅₀(DPPH).

Изучение антимикробной активности вышеуказанных образцов проводилось по отношению к штаммам грамположительных бактерий *Staphylococus aureus, Bacillus subtilis,* к грамотрицательным штаммам *Escherichia coli, Pseudomonaus aeruginosa* и к дрожжевому грибку *Candida albicans* методом диффузии в агар (лунок). Препараты сравнения — гентамицин для бактерий и нистатин для дрожжевого грибка *C. albicans*.

Культуры выращивали на жидкой среде pH 7.3 \pm 0.2 при температуре от 30 до 35°С в течение 18–20 часов. Культуры разводили 1 : 1000 в стерильном 0.9% растворе натрия хлорида изотоническом, вносили по 1 мл в чашки с соответствующими элективными, питательными средами для изучаемых тест-штаммов и засевали по методу "сплошного газона". После подсушивания на поверхности агара формировали лунки размером 6.0 мм, в которые вносили раствор исследуемого образца, гентамицина, нистатина. В контроле использовали этиловый спирт в эквиобъемных количествах. Посевы инкубировали при 37°С, учет растущих культур проводили через 24 часа.

выводы

1. На основании результатов исследования антирадикальных свойств синтезированных веществ установлено, что антирадикальная активность образцов 1 и 2 сопоставима с активностью известных антиоксидантов. Они обладает выраженным антирадикальным действием.

2. В результате проведенного биоскрининга на антимикробную активность установлено, что все исследованные вещества проявляют слабую антибактериальную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных тест-штаммов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит исследований с использованием людей или животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Rainsford, K.D.* Aspirine and Related Drugs. London, UK: CRC Press, 2004.
- Sahoo J. Paidesetty S.K. // Egyp. J. Bas. Appl. Sci. 2015. V. 2. P. 268–280. https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2015.07.006
- Djurendić E., Dojčinović Vujašković S., Sakač M. et al. // Arkivoc. 2011. V. 2. P. 83–102. https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0012.207
- 4. *Thun M.J., Jacobs E.J., Patrono C. //* Nat. Rev. Clin. Oncol. 2012. V. 9. P. 259–267.
- Pathirana R., West P., Hedderley D., Eason J. // Protoplasma. 2017. V. 254. P. 1–13.
- Spitz G.A., Furtado C.M., Sola-Penna M., Zancan P. // Biochem. Pharmacol. 2009. V. 77. P. 46–53.
- 7. *Ioana M.C., Iena C.U., Alfa Xenia Lupea et al.* // Rev. Chim. 2008. V. 59. № 2. P. 247–250.
- Martin Krátký, Jarmila Vinšová // Molecules. 2012. V. 17. P. 9426–9442. https://doi.org/10.3390/molecules17089426
timicrobial activity against gram-positive and gram-negative test strains showed weak antibacterial activity. *Keywords: antioxidant, antiradical activity, antimicrobial activity, strain, free radical, thiosemicarbazide, 1,2,4-*

triazole, DPPH

- Alicja Wodnicka, Elżbieta Huzar, Maria Krawczyk, Halina Kwiecień // Polish J. of Chem. Tech. V. 19. 1. P. 143–148. https://doi.org/10.1515/pict-2017-0019
- 10. *Runde Xiong, Dong Xu, Xiangpin Deng et al.* // Royal Soc. of Chem Medchemcomm 2019
- Soc. of Chem. Medchemcomm. 2019. https://doi.org/10.10.39/c8md00484f
- Evgenija Djurendić, Sanja Dojčinović Vujašković, Marija Sakač et al. // Arkivoc. 2011. V. 2. P. 83–102. https://doi.org/10/3998/.ark.5550190.0012.207
- 12. Fadeyi O.O., Obafemi C.A., Adewunmi C.O., Iwalewa E.O. // African J. of Biotech. 2004. V. 3. P. 426–431. https://doi.org/10.1.1.892.8817
- 13. *Herman Gerhon, Raulo Parmegiani //* Pfister Chemical Works, Ridgefield, New Jersey, 1962.
- Andressa Brito Lira, Camila de Albuquerque Montenegro, Kardilandia Mendes de Oliveira et al. // Hindawi. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2018. P. 14. ID 6179427.

https://doi.org/10.1155/2018/6179427

- 15. Перевозкина М.Г. // Инновации в науке: сб. ст. по матер. XXXVII междунар. науч.-практ. конф. № 9(34). Новосибирск: СибАК, 2014.
- Nurkenov O.A., Fazylov S.D., Satpaeva Zh.B. et al. // Russ. J. of Gen. Chem. 2014. V. 84. P. 1857–1859. https://doi.org/10.1134/S1070363214090369
- Nurkenov O.A., Fazylov S.D., Satpaeva Zh.B. et al. // Russ. J. of Gen. Chem. 2015. V. 85. P. 57–60. https://doi.org/10.1134/S1070363215010107
- 18. Niki E. // J. Chem. and Phys. Lipids. 1987. V. 44. P. 227–253.
- 19. Niki E., Takahashi M., Komiko E. // Chem. Letters. 1986. P. 1573-1576.
- 20. *Plattner S. et al.* // Anal. Bioanal. Chem. 2014. V. 406. P. 213–224.
- 21. *Навашин С.М., Фомина И.П.* Рациональная антибиотикотерапия // Справочник, М.: Медицина, 1982. 496 с.

Anti-Radical and Antimicrobial Activity of Thiosemicarbaside and 1,2,4-Triazole Derivatives of Hydroxybenzoic Acid

Zh. B. Satpaeva^{*, **, #}, Z. T. Shulgau^{***}, S. B. Akhmetova^{****}, O. A. Nurkenov^{**}, S. D. Fazylov^{*, **}, and M. Zh. Burkeev^{*}

[#]E-mail: satpaeva_zh@mail.ru

* Buketov State University, ul. Universitetskaya 28, Karaganda, 100028 Kazakhstan

** Institute of Organic Synthesis and Coal Chemistry of the Republic of Kazakhstan,

ul. Alikhanova 1, Karaganda, 100008 Kazakhstan

*** RSE "National Center for Biotechnology" of the Ministry of Education and Science of the Republic,

Korgalzhynskoye shosse 13/5, Nur-Sultan, 010000 Kazakhstan

**** Karaganda State Medical University, ul. Gogolya 40, Karaganda, 100000 Kazakhstan

The article presents the results of the evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of synthesized biologically active substances in comparison with the standard antioxidant – ascorbic acid. Antioxidant activity was studied by the ability to interact with the radical – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). It was established that under the conditions of this test system, 2-(2-hydroxybenzoyl)-N-phenylhydrazinecarboth-ioamide (1) IC₅₀(DPPH) = 15.5 μ M showed pronounced anti-radical activity, for 2-(4-hydroxybenzoyl)N-phenylhydrazinecarbothiamide (2) IC₅₀(DPPH) was found to be 31.7 μ M. The results of the evaluation of an-



СТРУКТУРА *n*-ХЛОРБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ ПО ДАННЫМ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА И РАСЧЕТА МЕТОДОМ DFT, А ТАКЖЕ РАСЧЕТ *in silico* МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА КИСЛОТЫ С ФЕРМЕНТОМ ТАНКИРАЗА I¹

© 2020 Doaa S El Sayed^{*, #}, Sabine Foro^{**}

*Chemistry Department, Faculty of Science, Alexandria University, P.O. box 426, Ibrahimia, Alexandria, 21321 Egypt **FB Material Wissenschaft, FG Strukturforschung, Technische Universitaet Darmstadt, Alarich-Weiss-Str. 2, Darmstadt, D-64287 Germany Поступила в редакцию 16.01.2020 г. После доработки 27.01.2020 г.

Принята к публикации 31.01.2020 г.

n-Хлорбензойная кислота несет атом хлора в положении 4, где он может влиять на координацию молекулы и контролировать определенные биологические параметры, он может ингибировать действие специфического фермента в организмах. Данные рентеноструктурного анализа дают количественную информацию о ковалентных и нековалентных взаимодействиях в 3D-формате. Перекристаллизацию *n*-хлорбензойной кислоты проводили для удаления возможных примесей и получения ее в чистом кристаллическом виде. С помощью рентгеноструктурного анализа изучены строение и геометрические параметры молекулы. Экспериментальные данные сравнивались с расчетными для оптимизированной структуры, полученной методом вычислительного квантово-механического моделирования — теории функционала плотности (DFT). Оказалось, что структура *n*-хлорбензойной кислоты представляет собой димер, стабилизированный межмолекулярными водродными связями. Изучены инфракрасные спектры и проведен термический анализ этого соединения. Структурные геометрические параметры оценены с помощью метода DFT. Молекулярный докинг in silico тестируемого лиганда в ферменте танкираза I показывает наличие ряда водородных связей, взаимодействий хлора и ароматического кольца, эти расчитанные взаимодействия могут ингибировать аминокислотные активные сайты фермента танкираза І. И поэтому такое ингибирование может препятствовать некоторым видам биологической активности, и особенно - противоопухолевому эффекту.

Ключевые слова: n-хлорбензойная кислота, кристаллография, инфракрасный, метод DFT, in silico, молекулярный докинг

DOI: 10.31857/S0132342320040259

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

[#] Автор для связи: (эл. почта: doaasaied75@yahoo.com).



УДК 577.113.4:577.113.7:577.27

МЕТОД ТЕРМИЧЕСКОЙ ДИССОЦИАЦИИ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СЕЛЕКЦИИ ДНК-АПТАМЕРОВ

© 2020 г. С. А. Лапа^{*, #}, В. Е. Шершов^{*}, Г. С. Краснов^{*}, О. С. Волкова^{*}, В. Е. Кузнецова^{*}, С. П. Радько^{**}, А. С. Заседателев^{*}, А. В. Чудинов^{*, **}

*ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32 **ООО "ИБМХ-ЭкоБиоФарм", Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

> Поступила в редакцию 18.12.2019 г. После доработки 25.12.2019 г. Принята к публикации 29.12.2019 г.

Разработан метод термической диссоциации комплексов ДНК/мишень (ТДА) для отбора аптамеров к альфа-фетопротеину человека. Метод основан на выявлении наиболее специфичных к мишени ДНК-олигонуклеотидов из комбинаторной ДНК-библиотеки, оставшихся в форме комплекса с мишенью после проведения двух стадий: а) отмывки несвязавшихся последовательностей и б) снятия с мишени связавшихся ДНК-последовательностей, но обладающих низким сродством к ней. После этого проводится термическая диссоциация оставшихся наиболее устойчивых комплексов и вовлечение соответствующих олигонуклеотидов в следующие раунды селекции. Показано более интенсивное обогащение библиотеки с использованием предложенного метода по сравнению со стандартной отмывкой. Благодаря созданию более жестких условий отмывки связавшихся с мишенью ДНК-олигонуклеотидов, использование термической диссоциации способно увеличивать эф-

Ключевые слова: ДНК-аптамеры, альфа-фетопротеин человека, термическая диссоциация аптамеров **DOI:** 10.31857/S0132342320040156

ВВЕДЕНИЕ

Аптамеры – одноцепочечные ДНК- или РНКолигонуклеотиды, способные проявлять аффинное сродство к широкому спектру биомолекул. Это качество позволяет рассматривать их в качестве функциональных аналогов моноклональных антител. Аптамеры находят применение в клинической диагностике, в настоящее время предпринимаются попытки их использования в качестве самостоятельных терапевтических средств [1, 2]. Процесс отбора специфичных к индивидуальной мишени аптамеров из исходной комбинаторной библиотеки олигонуклеотидов называется SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) и представляет собой ряд циклов связывания олигонуклеотидов с мишенью, выделение связавшейся фракции и амплификацию связавшейся фракции [3, 4]. В случае использования ДНК-библиотек, каждый цикл в методологии

SELEX можно разбить на несколько стандартных шагов-стадий:

 — взаимодействие ДНК-библиотеки, представляющей собой комбинацию из множества индивидуальных ДНК-олигонуклеотидов, с молекулярной мишенью;

 отмывка несвязавшихся с мишенью ДНКолигонуклеотидов;

 снятие с молекулы-мишени связавшихся ДНК-олигонуклеотидов;

 амплификация связавшихся ДНК-олигонуклеотидов;

 повторное вовлечение связавшихся ДНКолигонуклеотидов в раунды селекции с молекулярной мишенью с целью обогащения комбинаторной ДНК-библиотеки олигонуклеотидами с последовательностями, наиболее специфичными к заданной мишени.

Проведение селекции аптамеров из комбинаторных библиотек является сложной задачей, требующей комплексного подхода для успешного решения. Каждая из стадий селекции требует тщательного конструирования, и в настоящее время существует множество разновидностей методологии, направленных на оптимизацию процесса с

Сокращения: ТДА – термическая диссоциация аптамеров; АФП – альфа-фетопротеин; dUTP – 2'-дезоксиуридинтрифосфат; NHS – N-гидросисукцинимид; EDC – гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида; MES – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (495) 135-98-00; факс: +7 (495) 135-14-05; эл. почта: lapa@biochip.ru).

учетом выбранной природы исходной библиотеки (ДНК или РНК), мишени (малые молекулы, макромолекулы, живые клетки), применяемых ферментативных реакций (ПЦР, реакция удлинения праймера), доступной приборной базы (различные варианты "микрофлюидик", биологические микрочипы) и др.

Стадия отмывки является одним из наиболее важных этапов процесса. От ее эффективности зависит степень обогащения библиотеки специфическими к мишени олигонуклеотидами. В общепринятом варианте селекции аптамеров принцип отмывки заключается в разбавлении смеси целевой мишени с ДНК-библиотекой специальными буферными растворами. При этом как несвязавшиеся вовсе, так и связавшиеся ДНК-олигонуклеотиды библиотеки, но имеющие низкое сродство к мишени, отмываются.

В настоящее время существует множество форматов проведения селекции аптамеров. Авторы обзорной статьи [5] провели сравнение т.н. классического SELEX и различных современных вариантов, таких как селекция с применением капиллярного электрофореза, магнитных микрочастиц, различных разновидностей формата "микрофлюидик".

Капиллярный электрофорез для отбора аптамеров впервые предложен Mendonsa и соавт. в 2004 году [6]. Работа рассматривает применение капиллярного электрофореза для отбора аптамеров к человеческому иммуноглобулину E (IgE). При этом разделение комплексов от несвязавшихся олигонуклеотидов осуществляется по разнице их подвижности в электрическом поле. Авторы [7] описывают разработанный ими т.н. неравновесный капиллярный электрофорез равновесных смесей (NECEEM), который применим для анализа кинетических и термодинамических параметров пула нуклеиновых кислот. Путем подачи свободного от мишени буфера на вход капилляра мигрирующие комплексы медленно освобождались в зависимости от равновесной константы диссоциации аптамера и констант скорости ($k_{\rm d}$ и $k_{\rm off}$ соответственно), которые анализировались в электрофореграмме разделения.

В работе [8] предложен метод отмывки связавшихся аптамеров, использующий реакцию вытеснения цепи (strand displacement reaction). Авторы позиционируют предложенный подход вытеснения аптамера как для обнаружения целевых белковых мишеней, так и для повышения эффективности клеточного SELEX (cell-SELEX).

Интересный способ удаления неспецифичных последовательностей предложен в работе [9]. Для удаления несвязавшихся с белковой мишенью олигонуклеотидов использовали обработку нитроцеллюлозных мембран с нанесенным целевым белком и ДНК-библиотекой с помощью ДНКазы I, за которой следовала градиентная отмывка буферами, содержащими мочевину. Метод позволил получать специфичные к выбранной белковой мишени аптамеры за одну стадию селекции.

В настоящей работе предложен метод термической лиссоциации обогашенных библиотек аптамеров (ТДА) из электрофорезного геля после образования комплексов ДНК/мишень для увеличения сродства пула олигонуклеотидов обогащенной библиотеки к белковой мишени – альфафетопротеину человека. При этом заведомо неспецифичные ДНК-олигонуклеотиды предварительно отделяются от комплексов методом электрофореза в акриламидном геле, а ДНК-олигонуклеотиды, обладающие недостаточным сродством к мишени, удаляются методом экстракции из геля при разрушении комплексов ДНК/мишень. После этого проводится термическая диссоциация наиболее устойчивых комплексов и вовлечение соответствующих олигонуклеотидов в следующие раунды селекции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целью настоящего исследования явилась разработка способа обогащения ДНК-библиотек для селекции аптамеров с применением термической диссоциации комплексов лиганд – мишень (ТДА) на примере ДНК-библиотек и мишени белковой природы.

В качестве целевого белка использован альфафетопротеин человека (АФП), являющийся маркером пре- и неонатальных заболеваний, а также онкомаркером некоторых видов рака. АФП представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 69 000 Да, состоящий из одной полипептидной цепи, включающей около 600 аминокислот. Эксперимент проводили как с применением немодифицированной (природной) ДНК-библиотеки, так и с введением модифицированного трифосфата дозоксиуридина (mod-dUTP), структура которого приведена на рис. 1.

Для инициирующего обогащения комбинаторных библиотек проводили пять раундов селекции с иммобилизованным на магнитных частицах целевым белком (АФП), включающих стадии: отрицательная селекция к магнитным частицам, образование комплекса с белком, отмывка, амплификация специфичных к белку ДНК-олигонуклеотидов. При амплификации обогащенных в процессе селекции ДНК-библиотек использовали биотинилированный праймер для разделения цепей на магнитных частицах. Для получения целевой цепи использовали праймер, флуоресцентно-меченный цианиновым красителем Су5. Введение метки позволяло при электрофоретическом разделении достоверно визуализировать полосу, соответствующую цепи аптамера.



Рис. 1. Производное 5-аминоаллил-2'-дезоксиуридин-5'-трифосфата, модифицированное по аминоаллильному фрагменту фенилмасляной кислотой.



Рис. 2. Электрофореграмма, показывающая разделение комплексов ДНК-олигонуклеотидов с белком от несвязавшихся ДНК-олигонуклеотидов после 5-го раунда селекции до применения ТДА. 1 – комплекс одноцепочечной ДНКбиблиотеки (химически модифицированная) с альфа-фетопротеином человека (АФП); 2 – одноцепочечная ДНКбиблиотека (химически модифицированная); 3 – комплекс одноцепочечной ДНК-библиотеки (природная) с АФП, 4 – одноцепочечная ДНК-библиотека (природная); 5 — маркер длин ДНК "GeneRuler 50 bp" (Thermo Scientific, США); 6 – АФП. Лунки 1–5, окрашивание SYBR Green I (Invitrogen, США). Лунка 6 – окрашивание "кумасси". В лунки 2 и 4 добавляли в пять раз меньшее количество библиотеки в пересчете на ДНК по сравнению с лунками 1 и 3, поскольку данные лунки использовались исключительно для оценки подвижности олигонуклеотидов библиотеки (15 пмоль для лунок с комплексом ДНК/АФП и 3 пмоль для свободных библиотек). В качестве электродного буфера использовали 1× TBE-буфер.

После этого обогащенные библиотеки инкубировали со свободным АФП в микромолярных концентрациях, и полученный комплекс ДНК/белок подвергали электрофоретическому разделению в акриламидном геле для отделения несвзязавшихся с белком олигонуклеотидов (рис. 2). Стрелками показаны: комплексы олигонуклеотидов обогащенных библиотек с АФП, несвязавшиеся олигонуклеотиды, свободный АФП без добавления ДНК-библиотеки. Из рисунка видно, что при электрофоретическом разделении визуализируются образовавшиеся комплексы ДНК/белок.

С учетом молекулярной массы $A\Phi\Pi$ и длины модифицированных олигонуклеотидов, входящих в состав библиотеки, был выбран следующий состав геля: 12% акриламид/*бис*-акриламид (19 : 1) в 1× TBE, содержащем 10 mM KCl и 3 mM MgCl₂. Наличие в буфере солей калия и магния обусловлено необходимостью стабилизировать неканонические типы вторичной структуры ДHK, которые могут присутствовать в аптамерах: G-квадруплексы и шпилечные структуры ДНК. Разделение проводили при поддерживаемой термостатом температуре 20°С, что предотвращает неконтролируемую термическую диссоциацию комплексов в процессе электрофореза. С этой же целью в электрофоретической ячейке поддерживали относительно невысокое напряжение (порядка 120–150 вольт на 20 см геля).

Затем осуществляли элюцию из соответствующего участка геля связавшихся аптамеров в водный раствор 2%-ного перхлората лития с сохранением микромолярных концентраций аптамеров и их мишени. Это позволило сохранить неразрушенные комплексы наиболее специфичных аптамеров с целевым белком, но удалить аптамеры с низким сродством к мишени. Гель после элюции использовали для проведения термической диссоциации.

Термическая диссоциация представляет собой процесс разложения комплексов лиганд-мишень под воздействием температуры, характеризующийся константой равновесия, или степенью диссоциации. Поскольку диссоциация сопровождается поглощением энергии, в соответствии с принципом Ле Шателье—Брауна нагрев увеличивает степень диссоциации и смещает равновесие в направлении продуктов разложения [10]. Нами предложено использовать это свойство при проведении селекции аптамеров и обогащения библиотек последовательностями олигонуклеотидов, характеризующимися большими показателями сродства к использованной белковой мишени.

Электрофорезный гель после элюции инкубировали при температуре 60°С в течение 20 мин в водном растворе 2%-ного перхлората лития без использования хаотропных агентов и детергентов. Разрушение сохранившихся комплексов приводило к получению фракции наиболее специфичных аптамеров. В случае взаимодействия ДНК/белок, процессы, протекающие при проведении ТДА, характеризуются не только увеличением скорости обратимой равновесной реакции разложения комплексов. Важную роль играют также два процесса – обратимый (разрушение вторичной структуры олигонуклеотидов) и необратимый (термическая денатурация целевого белка). Следует заметить, что для термолабильных белков термическая диссоциация обязательно сопровождается денатурацией белка, что не мешает осуществлению метода. Предположительно, метод может обладать селективностью к определенным типам аптамеров либо их конформаций с более термостабильными вторичными структурами или более высокими энергиями взаимодействия с мишенью. Это отличает предлагаемый метод от классического метода отмывки буферными растворами, где смещение равновесия в изотермических условиях достигается изменением концентрации лиганда и мишени.

ДНК-библиотеки после первого раунда ТДА амплифицировали и подвергали термической диссоциации после инкубации с мишенью еще дважды. В результате получали обогащенные высокоспецифичными аптамерами библиотеки, готовые к проведению секвенирования для определения индивидуальных нуклеотидных последовательностей.

Проводили сравнение эффективности способа термодиссоциации с базовым вариантом селекции аптамеров методом электрофоретического разделения комплексов ДНК/АФП. На рис. 3 представлена электрофореграмма, показывающая образование комплекса обогащенной одноцепочечной ДНК-библиотеки с целевым белком (АФП) после проведения пяти раундов селекции на магнитных частицах и трех раундов ТДА. В качестве контроля использовали библиотеку, обогащенную в восемь раундов без ТДА. В обоих случаях использовали эквимолярные количества АФП и обогащенных ДНК-библиотек. Измеряли интенсивности свечения окрашенных SYBR Green I (Invitrogen, США) целевых полос с помощью программы ImageJ (INH, США). Значение оптической плотности полосы комплекса с библиотекой, полученной методом ТДА, превышало на ~30% значение оптической плотности контрольной полосы. По разнице в оптической плотности образовавшихся комплексов с АФП наблюдали преимущество метода ТДА по сравнению со стандартной отмывкой.

Таким образом, показано обогащение ДНКбиблиотек с помощью разработанного метода и возможность его применения для проведения SELEX к белковым мишеням, в том числе с использованием модифицированных нуклеотидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Комбинаторные ДНК-библиотеки и праймеры

Последовательности использованных в работе комбинаторных библиотек, праймеров для их амплификации и особенности их твердофазного синтеза описаны ранее в [11].

Полимеразная цепная реакция

Амплификацию ДНК-библиотек после каждого цикла SELEX производили методом ПЦР. Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) и 2.5 единицы (на реакционный объем 50 мкл) Тад ДНК-полимеразы (ThermoFisher, США) для немодифицированных библиотек либо 0.5 единиц Vent (exo-) полимеразы (NEB, США) в случае модифицированных библиотек. Смесь содержала трифосфаты (dATP, dCTP, dGTP и dTTP) в концентрации 0.2 mM каждого. В случае модифицированных библиотек смесь вместо dTTP содержала модифицированный трифосфат дезоксиуридина (рис. 1). Рабочая концентрация праймеров составляла 100 nM каждого. Один из праймеров был окрашен цианиновым красителем Су5 для формирования окрашенной цепи аптамера, второй праймер нес биотиновую метку. Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе Dyad (Bio-Rad, США) по следующей программе: 4 мин при 95°С; 20 циклов по 30 с при 95°С, 30 с при 66°С и 40 с при 72°С; завершали реакцию инкубированием в течение 3 мин при 72°С.

Разделение цепей ДНК на магнитных частицах

Для получения однонитевой ДНК с красителем Су5 на 5'-конце проводили разделение цепей на магнитных частицах Dynabeads[™] M-270 Streptavidin (Invitrogen Dynal AS, Norway). Биотинилированную по 5'-концу двухцепочечную ДНК (ПЦР-

МЕТОД ТЕРМИЧЕСКОЙ ДИССОЦИАЦИИ



Рис. 3. Электрофореграмма комплексов АФП с ДНК-библиотеками. Лунка № 1 – молекулярный маркер длин ДНК "GeneRuler 50bp" (Thermo Scientific, США), лунка № 2 – обогащенная ДНК-библиотека, полученная с применением способа термической диссоциации (15 пмоль) после инкубации с АФП (15 пмоль), лунка № 3 – обогащенная ДНК-библиотека, полученная без применения способа термической диссоциации (15 пмоль) после инкубации с АФП (15 пмоль) после инкубации с АФП (15 пмоль), лунка № 3 – обогащенная ДНК-библиотека, полученная без применения способа термической диссоциации (15 пмоль) после инкубации с АФП (15 пмоль). Видно, что оптическая плотность комплекса ДНК/АФП выше в лунке № 2. В качестве электродного буфера использовали 1× SELEX-буфер.

продукт, объем 50 мкл) смешивали с эквивалентным объемом 10× ПЦР-буфера для Таq-полимеразы (Thermo Scientific, США), pH 8.8, нагревали до 95°С, инкубировали 3 мин и охлаждали до комнатной температуры. Связывание ПЦР-продукта с магнитными частицами проводили в 5× ПЦРбуфере при 25°С в течение 30 мин при постоянном перемешивании. С помощью магнитосепаратора магнитные частицы с иммобилизованной на них двухцепочечной ДНК отделяли от реакционной смеси и промывали трижды 5× буфером.

Небиотинилированную цепь элюировали добавлением к магнитным частицам 20% раствора гидроксида аммония, инкубировали 2 мин, затем частицы отделяли на магнитном сепараторе, элюат переносили в чистую пробирку и переосаждали спиртовым раствором, содержащим 0.125 М ацетата аммония и 70% этанола. Одноцепочечную небиотинилированную ДНК осаждали цетрифугированием (16000 g, 2 мин). Осадок промывали спиртовым раствором ацетата аммония, затем 96% этиловым спиртом и высушивали на воздухе. К высушенному осадку добавляли 20 мкл деионизованной воды (MQ-H₂O) и определяли концентрацию ДНК на спектрофотометре NanoDrop 1000.

Магнитные частицы с биотинилированной цепью промывали 20% гидроксидом аммония 1 мин при комнатной температуре, затем супернатант удаляли, а частицы инкубировали с 50 мкл 30% гидроксида аммония при 60°С при эпизодическом ручном перемешивании в течение 8 мин. Элюат переносили в чистую пробирку, где переосаждали биотинилированную цепь добавлением 5 объемов спиртового раствора ацетата аммония, содержащего 0.125 М ацетата аммония и 70% этанола. Осадок промывали спиртовым раствором ацетата аммония, затем 96% этиловым спиртом и высушивали на воздухе. К высушенному осадку добавляли 20 мкл деионизованной (MQ) H_2O и определяли концентрацию ДНК на спектрофотометре NanoDrop 1000. Эффективность разделения цепей определяли электрофоретическим методом.

Эффективность элюции ДНК контролировали, добавляя к магнитным частицам 40 мкл раствора, содержащего 8 М мочевины и 2 М тиомочевины, что приводило к элюции всей ДНК, оставшейся на магнитных частицах. Элюат анализировали методом ПААГ-электрофореза.

Приготовление иммобилизованного препарата АФП

Препараты водных растворов АФП были охарактеризованы с помощью иммуноферментного анализа с использованием набора АФП-ИФА (Хема, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Для иммобилизации АФП использовали магнитные частицы Dynabeads MyOne Carboxylic acid (ThermoFisher, США). Иммобилизацию проводили с использованием двухступенчатого протокола на основе N-гидросисукцинимида (NHS) и гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC). Частицы промывали дважды 25 mM MES pH 6 порциями по 300 мкл в течение 10 мин при перемешивании пипеткой. Готовили свежие растворы EDC и NHS в холодном растворе MES концентрацией 50 мг/мл. Смешивали по 50 мкл растворов EDC и NHS с промытыми частицами Dynabeads и инкубировали при комнатной температуре 30 мин при медленном вращении. После инкубации проводили отделение частиц от раствора с помошью магнитного сепаратора и промывали частицы дважды холодным раствором MES порциями по 300 мкл. Добавляли АФП в 100 мкл раствора MES и инкубировали при комнатной температуре 1 ч при медленном вращении. Отделяли частицы от раствора на магнитном сепараторе и проводили кэпирование в 50 mM Tris HCl pH 7.4 в течение 15 мин. Готовые к использованию частицы хранили до 3 недель при 4°С в 25 mM Tris HCl pH 7.4, либо до 3 месяцев в том же буфере в 50% глицерине при –20°С. Растворы содержали 0.02% азида натрия.

Определение нагрузки магнитных частиц по АФП проводили с помощью набора АФП-ИФА (Хема, Россия).

Образование комплекса одноцепочечной ДНК-библиотеки с иммобилизованным АФП

Первые пять раундов селекции проводили с использованием иммобилизованного препарата АФП. Модифицированную одноцепочечную библиотеку нагревали до 95°С в течение 2 мин и охлаждали до 37°С. Проводили раунд контр-селекции на магнитных частицах, не содержащих иммобилизованный АФП в 1× SELEX-буфере, приготовленном из 2× SELEX-буфера, имеющего pH 7.5 и содержащего 0.30 M NaCl, 60 mM HEPES, 20 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 0.1% TWEEN-20. АФП, иммобилизированный на магнитных частицах с концентрацией 15 пмоль/мг, промывали 1× SELEXбуфером. Магнитные частицы разбавляли в 100 мкл 2× SELEX-буфера. Добавляли 100 мкл модифицированной одноцепочечной библиотеки, создавая молярное соотношении 5:1 к количеству иммобилизованного белка. Инкубировали 1 час при перемешивании, 37°С. Отбирали супернатант – несвязавшиеся олигонуклеотиды. Магнитные частицы, содержащие АФП со связавшимися последовательностями, промывали 1× SELEX-буфером при комнатной температуре, растворяли в 100 мкл H₂O качества MQ и инкубировали 10 мин при 95°С, супернатант отделяли, определяли его концентрацию на спектрофотометре NanoDrop 1000 и использовали в дальнейших раундах SELEX.

Образование комплекса одноцепочечной ДНК-библиотеки с АФП в растворе

Модифицированную одноцепочечную библиотеку нагревали до 95°С в течение 2 мин и медленно охлаждали до 37°С. К 50 мкл водного раствора АФП с концентрацией 30 пмоль/мкл добавляли 50 мкл 2× SELEX-буфера. Добавляли 100 мкл модифицированной одноцепочечной библиотеки с концентрацией 15 пмоль/мкл. Инкубировали 1 час при перемешивании при 37°С.

Электрофоретическое разделение комплексов ДНК/АФП и несвязавшихся олигонуклеотидов

Метод применяли в качестве одного из трех циклов SELEX с использованием ТДА. Электрофорез проводили на термостатируемом приборе Protean II xi Cell (Bio-Rad, США).

Готовили электрофорезный гель следующего состава: 12% акриламид/бис-акриламид (19:1) в 1× ТВЕ, содержащий 10 mM KCl и 3 mM MgCl₂. В лунки вносили по 20 мкл комплекса ДНК/АФП, свободную библиотеку, а также контроли. Электрофорез проводили при контролируемой температуре 20°С при напряжении порядка 120-150 вольт на 20 см геля. Контроль миграции связанной и несвязанной ДНК осуществляли с использованием 45-мерного флуоресцентно-меченного олигонуклеотида. Электрофорез проводили до длины пробега олигонуклеотидного контроля – 5–7 см. В качестве дополнительных контролей были использованы: несвязанная с АФП модифицированная библиотека после 5-го раунда, маркер длин ДНК GeneRuler 50bp (Thermo Scientific, США) и АФП и/или белковый маркер Precision Plus Protein 10-250 кДа (Bio-Rad, США).

Визуализацию полос в геле проводили с использованием SYBR Green I (Invitrogen, США) для ДНК и Кумасси для белков. По электрофоретической картине оценивали количество связавшейся с АФП и несвязавшейся ДНК.

Элюция ДНК из геля

Полосы геля, содержащие комплекс ДНК/ АФП, вырезали, помещали в пробирку объемом 1.5 мл и проводили элюцию связавшихся с белком ДНК-олигонуклеотидов, с помощью 100 мкл раствора LiClO₄ в H₂O (Milli-Q). Смесь инкубировали 60 мин при 37°С, центрифугировали пробирки при 2000 об./мин в течение 2 мин, супернатант отбирали и измеряли концентрацию ДНК на спектрофотометре NanoDrop 1000. ДНК, содержащуюся в полученном супернатанте, не использовали для дальнейших раундов селекции. Оставшийся в пробирках гель использовали для проведения термической диссоциации ДНК-олигонуклеотидов, обладающих повышенным сродством к АФП.

Термическая диссоциация ДНК-олигонуклеотидов, обладающих повышенным сродством к АФП

К гелю после элюции добавляли 100 мкл 1× SELEX-буфера, нагревали до 60°С и инкубировали в течение 20 мин. Супернатант отделяли, определяли концентрацию ДНК на спектрофотометре NanoDrop 1000. Элюат после термической диссоциации вовлекали в последующий из трех раундов селекции, в состав которого входит этап термической диссоциации. После проведения трех раундов SELEX с термической диссоциацией получали обогащенную ДНК-библиотеку, пригодную для определения индивидуальных последовательностей олигонуклеотидов, входящих в ее состав.

Для оценки эффективности обогащения библиотек методом ТДА проводили инкубацию библиотек с АФП (15 пмоль) и последующий электрофорез комплексов АФП с ДНК-библиотеками аналогично тому, как описано выше. Эффективность связывания ДНК с АФП оценивали по разнице оптической плотности полос, соответствующих образовавшемуся комплексу ДНК/АФП. Измерения оптической плотности проводили с помощью программы ImageJ (NIH, США).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014— 2020 годы" (соглашение № 14.576.21.0096, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57617X0096).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты проводились *in vitro*. Работа не содержит исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- *Zhu G., Chen X.* // Adv. Drug Deliv. Rev. 2018. V. 134. P. 65–78.
- 2. *Adachi T., Nakamura Y. //* Molecules. 2019. V. 24 (23). pii: E4229.
- 3. Tuerk C., Gold L. // Science. 1990. V. 249. P. 505-510.
- Ellington A.D., Szostak J.W. // Nature. 1990. V. 346. P. 818–822.
- Dembowski S.K., Bowser M.T. // Analyst. 2017. V. 143. P. 21–32.
- Mendonsa S.D., Bowser M.T. // J. Am. Chem. Soc. 2004. V. 126. P. 20–21.
- Berezovski M.L., Drabovich A., Krylova S.M., Musheev M., Okhonin V., Petrov A., Krylov S.N. // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 3165–3171.
- Li L., Chen X., Cui C., Pan X., Li X., Yazd H.S., Wu O., Qiu L., Li J., Tan W. // J. Am. Chem. Soc. 2019. V. 141. P. 17174–17179.
- 9. *Liu Y., Wang C., Li F., Shen S., Tyrrell D.L., Le X.C., Li X.F. //* Anal. Chem. 2012. V. 84. P. 7603–7606.
- Le Chatelier H., Boudouard O. // Bulletin de la Société Chimique de France. 1898. V. 19. P. 483–488.
- Лапа С.А., Ромашова К.С., Спицын М.А., Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Гусейнов Т.О., Заседателева О.А., Радько С.П., Тимофеев Э.Н., Лисица А.В., Чудинов А.В. // Молек. биол. 2018. Т. 52. С. 984–996.

Method of Thermal Dissociation for the Selection of DNA-Aptamers

S. A. Lapa^{*, #}, V. E. Shershov^{*}, G. S. Krasnov^{*}, O. S. Volkova^{*}, V. E. Kuznetsova^{*}, S. P. Radko^{**}, A. S. Zasedatelev^{*}, and A. V. Chudinov^{*, **}

[#]Phone: +7 (495) 135-98-00; fax: +7 (495) 135-14-05; e-mail: lapa@biochip.ru

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia **IBMC-EcoBioPharm Ltd., ul. Pogodinskaya 10, str. 8, Moscow, 119121 Russia

A method of thermal dissociation of DNA/target complexes (TDA) for selection of aptamers to human alpha-fetoprotein has been developed. The method is based on the identification of the most target-specific DNA oligonucleotides from the combinatorial DNA library, remaining in the form of a complex with the target after two stages: (a) washing of unbound sequences and (b) removal of bound DNA sequences from the target, but having low affinity for it. After that, the thermal dissociation of the remaining most stable complexes and the involvement of the corresponding oligonucleotides in the next rounds of selection are carried out. A more intensive enrichment of the library using the proposed method is shown in comparison with the standard wash. Due to the creation of more stringent conditions for washing the target-bound DNA oligonucleotides, the use of thermal dissociation can increase the efficiency of selection of highly specific aptamers for their molecular targets.

Keywords: DNA aptamers, human alpha-fetoprotein, thermal dissociation of aptamers

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 4 2020



УДК 577.113.4:577.151.35

ОДНОВРЕМЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ Су5-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДЕЗОКСИУРИДИНА И ДЕЗОКСИЦИТИДИНА В ПЦР

© 2020 г. С. А. Лапа^{*, #}, Т. О. Гусейнов^{*}, А. С. Павлов^{*}, В. Е. Шершов^{*}, В. Е. Кузнецова^{*}, А. С. Заседателев^{*}, А. В. Чудинов^{*}

*ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 23.12.2019 г. После доработки 26.12.2019 г. Принята к публикации 31.12.2019 г.

Изучены особенности одновременного встраивания в растущую цепь ДНК модифицированных Су5-дезоксиуридинов (Су5-dU) и дезоксицитидинов (Су5-dC) в ПЦР с Таq ДНК-полимеразой. Исследования проводили для попарного встраивания нуклеотидов, модифицированных флуорофорами, обладающими суммарным положительным, нейтральным и отрицательным зарядом. Варьировали долю модифицированых дезоксинуклеозидтрифосфатов (Су5-dUTP и Су5-dCTP) к природным аналогам (dTTP и dCTP) от 0 до 100% каждого в реакции, т.е. до полного замещения. Проводили сравнение с индивидуальным встраиванием соответствующих модифицированных производных. Пары (Су5-dU + Су5-dC) применяли для амплификации фрагментов бактериальных геномов длиной 126, 283 и 370 пар оснований. Увеличение длины амплифицируемого фрагмента ДНК снижало выход продукта при использовании Су5-модифицированных нуклеотидов в выбранных условиях амплификации. Электроотрицательные Су5-dNTPs проявляли наименьший ингибирующий эффект на ПЦР, в то время как электронейтральные – обеспечивали большую плотность встраивания меток в растущую цепь ДНК.

Ключевые слова: модифицированные дезоксинуклеозидтрифосфаты, индодикарбоцианиновые красители, ПЦР

DOI: 10.31857/S0132342320040168

ВВЕДЕНИЕ

Ферментативное получение модифицированных ДНК интенсивно используется как для введения меток в молекулярно-генетическом анализе, так и для расширения физико-химических свойств молекулярных сенсоров и модифицированных аптамеров [1].

Наиболее распространенным модифицированным субстратом ДНК-полимераз является дезоксиуридинтрифосфат (dUTP) с различными функциональными группами, введенными по C5-положению пиримидинового цикла [1–3]. Меньшее распространение модифицированных производных трифосфатов дезоксицитидина (dCTP) и пуриновых оснований (dATP, dGTP) связано с более сложным синтезом. В последнее время появляются сообщения об успешном применении модифицированных dCTP в ферментативных реакциях амплификации ДНК [4, 5]. Идет активный поиск новых производных трифосфатов как пиримидиновой, так и пуриновой природы [6–8].

Важной задачей является изучение одновременного множественного встраивания модифицированных нуклеотидов в одну цепь ДНК. Преимуществами одновременного использования разноименных модифицированных нуклеотидов (например, dU и dC) является, с одной стороны, увеличение чувствительности анализа при ферментативном введении меток, с другой расширение спектра мишеней для создания высокоспецифичных аптамеров с несколькими модифицированными группами [9, 10].

На сегодняшний момент данных по одновременному использованию нескольких модифицированных трифосфатов недостаточно. Одна из первых успешных попыток параллельного введения различных модифицированных нуклеотидов в процессе амплификации ДНК была осуществлена в 2003 году [11]. Описан ПЦР-продукт, при получении которого природные трифосфаты в ПЦР были замещены модифицированными dUTP, dCTP и dATP. В коротком сообщении не обсуждалось практическое применение полученных результа-

Сокращения: dT – 2'-дезокситимидин; dC – 2'-дезоксицитидин; Cy5-dUTP – флуоресцентно-меченный 2'-дезоксиуридин-5'-трифосфат; Cy5-dCTP – флуоресцентно-меченный 2'-дезоксицитидин-5'-трифосфат.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (495) 135-98-00; факс: +7 (495) 135-14-05; эл. почта: lapa@biochip.ru).

тов. В 2017 году введение двух модифицированных оснований в одну цепь ДНК было применено для поиска высокоспецифичных аптамеров к белковой мишени [10]. Установлено, что нахождение определенных парных комбинаций модифицированных нуклеотидов может приводить к более высокому сродству к мишени, увеличивать метаболическую стабильность и ингибирующий терапевтический эффект по сравнению с аптамерами, содержащими одну модификацию.

Ранее нами было показано, что в ПЦР с короткой ДНК-матрицей бактериального генома [12] и короткой синтетической матрицей [13] — наиболее подходящими субстратами являются Су5-модифицированные dU с нейтральным электрическим зарядом флуорофора. При этом изучали только индивидуальное введение в ДНК каждого из модифицированных производных.

В настоящей работе изучено одновременное применение в ПЦР аналогов dU и dC, модифицированных индодикарбоцианиновыми красителями (ряд Cy5) с различным зарядом флуорофора. В качестве ДНК-матриц применены фрагменты бактериальных геномов различной длины. Амплификацию матриц проводили с помощью Taq ДНК-полимеразы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучено поведение Су5-производных трифосфатов дезоксиуридина (Су5-dU) и дезоксицитидина (Су5-dC) в качестве субстратов Таq ДНКполимеразы в ПЦР при замещении природных dTTP и dCTP. Флуорофоры, введенные по пиримидиновому основанию дезоксинуклеозидов, различались суммарным электрическим зарядом положительным, нейтральным и отрицательным и по этому признаку были распределены на пары Су5-dU1 (+) и Су5-dC1 (+), Су5-dU2 (0) и Су5dC2 (0), Су5-dU3 (–) и Су5-dC3 (–), где в скобках указано значение суммарного заряда флуорофора. Структуры соединений приведены на рис. 1.

Пиримидиновое основание производных дезоксиуридина связано по 5-положению с флуоресцентеными красителями через аминоаллильный линкер Е-транс двойной связью. Пиримидиновое основание производных дезоксицитидина связано по 5-положению с флуоресцентными красителями через аминопропаргильный линкер тройной связью. Модифицированные производные пиримидиновых нуклеотидов с обоими вариантами линкеров, связанными с 5-положением, ориентируют заместители в широкую бороздку двухспиральной ДНК и способны восприниматься ДНК-полимеразами в качестве субстратов [14, 15].

Проводили замену в реакционной смеси одного из природных dNTP на каждый из модифицированных аналогов индивидуально в отдельных реакциях. Массовую долю модифицированного производного по отношению к соответствующему природному трифосфату дезоксинуклеозида увеличивали от 0 до 100%. Для амплификации использовали фрагмент *гроВ*-гена *Мусоbacterium tuberculosis*. Ингибирующий эффект определяли по оптической плотности ПЦР-продуктов при электрофоретическом разделении реакционной смеси.

Изучали субстратное поведение и эффект ингибирования ПЦР при одновременном использовании разноименных модифицированных нуклеотидов в одной реакции ПЦР (Cy5-dU + Cy5-dC) по сравнению с инливилуальным использованием одного производного (Cy5-dU или Cy5-dC). При этом массовые доли модифицированных производных увеличивали соответственно, т.е. 0% Су5dU + 0% Cy5-dC, 5% Cy5-dU + 5% Cy5-dC – и так далее до полного замещения природных dT и dC при сохранении постоянной суммарной концентрации (Cv5-dU + dT) и (Cv5-dC + dC), которая составляла 200 мкМ. Выход измеряли по оптической плотности соответствующих полос электрофорезного геля с помощью программы ImageJ (NIH, США). Данные приведены в табл. 1. Выход для каждого модифицированного производного и их комбинаций нормировали на выход с применением в реакции только природных дезоксинуклеозидтрифосфатов (соответствует столбцу табл. 1 с массовой долей замены 0%). Одновременное использование разноименных модифицированных производных не приводило к статистически значимому увеличению ингибирующего эффекта по сравнению с использованием их по-отдельности в тех же концентрациях. Т.е. не наблюдали накопления эффекта ингибирования при совместном применении. Наиболее сильно выраженный ингибирующий эффект в ПЦР наблюдали для модифицированных dU и dC с суммарным положительным зарядом, минимальный – для отрицательнозаряженных.

Суммарно-электронейтральные производные с распределенным зарядом (цвиттер-ионы), при заметном ингибирующем эффекте, показывали хорошую плотность встраивания в растущую цепь ДНК. В то время как отицательно заряженные, при минимальном ингибирующем эффекте, демонстрировали минимальную же плотность встраивания. Субстратную эффективность определяли по совокупности показателей кинетики амплификации (эффективность амплификации Е) и плотности встраивания метки в растущую цепь ДНК. Плотность встраивания и эффективность амплификации определяли с помощью гибридизационного анализа и ПЦР в режиме реального времени, соответственно, как описано в [12, 16]; полученные данные будут обсуждены в отдельной публикации.





БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 4 2020

ровка произведена на выход реакции с использованием только природных дезоксинуклеозидтрифостфатов

Таблица 1. Сравнительные нормированные выходы продуктов при ПЦР-амплификации фрагмента гена *rpoB Mycobacterium tuberculosis*, определенные по оптической плотности полосы целевого продукта в электрофорезном геле. Массовая доля модифицированного дезоксинуклеозида указана в процентах по отношению к общему количеству одноименного модифицированного и немодифицированного трифосфата дезоксинуклеозида. Норми-

Модифицированный субстрат	Массовая доля, %					
	0	10	25	50	75	100
dUTP1 (+)	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
dUTP2 (0)	1.00	0.31	0.17	0.00	0.00	0.00
dUTP3 (–)	1.00	0.9	0.69	0.13	0.02	0.00
dCTP1 (+)	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
dCTP2 (0)	1.00	0.48	0.19	0.00	0.00	0.00
dCTP3 (-)	1.00	1.00	0.81	0.15	0.03	0.00
dUTP1 (+) + dCTP1 (+)	1.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
dUTP2 (0) + dCTP2 (0)	1.00	0.45	0.12	0.00	0.00	0.00
dUTP3 (-) + dCTP3 (-)	1.00	1.14	0.95	0.11	0.01	0.00

Изучали возможность применения пар (Cv5dU + Cy5-dC) для амплификации фрагментов бактериальных геномов длиной 126, 283 и 370 п. о. Наблюдали усиление ингибирующего влияния модификаций на ПЦР с увеличением длины ПЦРпродуктов. Результаты амплификации бактериальных генетических мишеней различной длины приведены на рис. 2. Заметно снижение электрофоретической подвижности для электронейтральных Cy5-dNTPs по мере увеличения массовой доли модифицированных производных в реакционной смеси. По-видимому, это связано с возрастанием суммарного количества встроившихся электронейтральных производных в растушую цепь ДНК, т.е. с возрастанием плотности метки на одну молекулу ПЦР-продукта. Из рис. 2 видно, что при попарном одновременном введении в реакцию разноименных модифицированных нуклеотидов сохранялась зависимость от заряда флуорофора, обнаруженная ранее при индивидуальном введении модификаций. При попарном введении производных dU и dC с электроположительными флуорофорами наблюдался наибольший ингибирующий эффект, с электроотрицательными – наименьший.

Наблюдалась тенденция уменьшения выхода продукта с увеличением длины используемой матрицы для амплификации. Очевидно, при выбранных параметрах ПЦР длина амплифицируемого фрагмента существенно влияет на выход ПЦРпродуктов с увеличением массовой доли Су5-модифицированных субстратов. Следует ожидать, что оптимизация условий ПЦР для амплификации длинных фрагментов, а именно увеличение временных интервалов стадии элонгации праймеров, способно увеличить выход модифицированного целевого продукта.

Увеличение плотности встраивания метки за счет одновременного применения разноименных модифицированных нуклеотидов способно повысить чувствительность молекулярно-генетического анализа. Применение флуоресцентно-модифицированных dC в дополнение к dU, учитывая отсутствие наблюдаемого накопительного эффекта ингибирования при совместном использовании, когда суммарная концентрация модификации увеличивается в два раза по сравнению с индивидуальным использованием, предпочтительно для анализа ГЦ-богатых последовательностей.

По результатам исследования можно заключить, что при одновременном введении в ПЦР Су5-модифицированных производных разноименных нуклеотидов, наименьшим ингибирующим эффектом на ДНК-полимеразу обладают соединения с отрицательным зарядом флуорофора. При этом, по данным гибридизационного анализа, наибольшая плотность введения меток достигается при попарном использовании электронейтральных Су5-модифицированных производных dU и dC, но с меньшим выходом целевого продукта.

Выход целевых продуктов амплификации при одновременном использовании модифицированных dU и dC в ПЦР уменьшается с увеличением длины ПЦР-продуктов и с увеличением массовой доли модифицированных производных в реакционной смеси. Mycobacterium tuberculosis, фрагмент гена rpoB, 126 п. о.



Staphylococcus aureus, фрагмент гена ebpS, 283 п. о.



Legionella pneumophila, фрагмент гена sidA, 370 п. о.



Рис. 2. Агарозный электрофорез продуктов ПЦР с бактериальных геномных мишеней различной длины с использованием пар Су5-модифицированных производных дезоксиуридина и дезоксицитидина (замещение от 0 до 100% к природным аналогам для каждого dNTP в паре). L – маркер длин двухцепочечной ДНК GeneRuler 50bp (ThermoScientific, США), NC – отрицательный контроль. Цифровые обозначения над лунками геля обозначают процент замещения в ПЦР каждого из пары природных dTTP и dCTP на соотвествующие Су5-модифицированные аналоги при сохранении постоянной суммарной концентрации (Cy5-dNTP + природный dNTP) 200 мкМ. Окрашивание бромистым этидием.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Модифицированные трифосфаты дезоксинуклеозидов

Су5-модифицированные производные трифосфата дезоксиуридина и дезоксицитидина синтезировали по методу, описанному в [12, 17].

ДНК-матрицы для исследования субстратной эффективности Су5-модифицированных трифосфатов дезоксинуклеозидов

В работе использованы образцы геномной ДНК Mycobacterium tuberculosis из коллекции Лаборатории биологических микрочипов ФГБУН ИМБ РАН (Россия). Образцы геномной ДНК Staphylococcus aureus и Legionella pneumophila предоставлены ФБУН ГНЦ ПМБ (Россия). В качестве ДНК-матриц для амплификации использовали три бактериальных генетических мишени различной длины, принадлежащих возбудителям легочных инфекций человека.

А. Фрагмент гена *гроВ* из деконтаминированной геномной ДНК *Mycobacterium tuberculosis*, штамм H37rv; праймеры: прямой f1272 (5'-CGC-CGCGATCAAGGAGTTCT-3') и обратный r1398 (5'-TCACGTGACAGACCGCCGGGG-3') [18]. Длина ПЦР-продукта – 126 п. о.

Для двух других бактериальных мишеней конструировали видоспецифичные праймеры и оптимизировали условия ПЦР.

Б. Фрагмент гена *ebpS* из деконтаминированной геномной ДНК *Staphylococcus aureus*, штамм АТСС 25923; праймеры: прямой ebpS-f1 (5'-ACTC-GACTGAGGATAAAGCGTCT-3') и обратный ebpSr1 (5'-CCTCCAAATATCGCTAATGCACC-3'). Длина ПЦР-продукта – 283 п. о. В. Фрагмент гена *sidA* из деконтаминированной геномной ДНК *Legionella pneumophila*, штамм ATCC 33152; праймеры: прямой sidA-f1 (5'-TTC-CACTGGTGGGTGGGGGTTTTG-3') и обратный sidA-r1 (5'-TCATGTTGGAGTTCTATGGCACG-3'). Длина ПЦР-продукта – 370 п. о.

Полимеразная цепная реакция

Для всех Су5-модифицированных трифосфатов дезоксиуридина и дезоксицитидина проводили ПШР как при индивидуальной замене соответствующего природного нуклеотида, так и при попарной замене от 0 до 100% каждого в реакционной смеси. Использовали Тад ДНК-полимеразу (Thermo Scientific, США), количество которой в реакционную смесь брали согласно рекомендациям производителя. Реакционная смесь содержала 200 мкМ каждого из природных дезоксинуклеозидтрифосфатов dATP и dGTP. Количество природных dTTP и dCTP варьировали в зависимости от массовой доли при их замене на модифицированные аналоги при соблюдении суммарной концентрации (Cy5-dUTP + dTTP), равной 200 мкМ, и суммарной концентрации (Су5-dCTP + dCTP), также равной 200 мкМ. Замену природного нуклеотида на флуоресцентный аналог проводили с увеличением массовой доли последнего от 0 до 100%, т.е. до полного замещения природного аналога. Матрицы для амплификации добавляли в реакционную смесь в количестве 10⁵ копий на реакционную пробирку.

Температурно-временной профиль ПЦР состоял из предварительной денатурации при 95° С в течение 3 мин, за которой следовали 40 циклов: 95° С в течение 30 с, 66° С в течение 30 с, 72° С в течение 40 с и далее завершающая инкубация при 72° С в течение 5 мин.

Определение выхода продуктов амплификации

Полученные ПЦР-продукты разделяли в 4% агарозном геле. Окрашивание проводили бромидом этидия. Количество продукта оценивали по оптической плотности соответствующих полос в дорожках геля с использованием программы ImageJ (NIH, США).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-04-01217.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит исследований с использованием людей или животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Hollenstein M.* // Molecules. 2012. V. 17. P. 13569–13591.
- Pinheiro V.B., Holliger P. // Trends Biotechnol. 2014. V. 32. P. 321–328.
- Lapa S.A., Chudinov A.V., Timofeev E.N. // Mol. Biotechnology. 2016. V. 58. P. 79–92.
- Sandin P., Stengel G., Ljungdahl T., Börjesson K., Macao B., Wilhelmsson L.M. // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37. P. 3924–3933.
- Kielkowski P., Cahová H., Pohl R., Hocek M. // Bioorg. Med. Chem. 2016. V. 24. P. 1268–1276.
- Matyašovský J., Perlíková P., Malnuit V., Pohl R., Hocek M. // Angew Chem. Int. Ed. Engl. 2016. V. 55. P. 15856–15859.
- Brázdilová P., Vrábel M., Pohl R., Pivonková H., Havran L., Hocek M., Fojta M. // Chemistry. 2007. V. 13. P. 9527–9533.
- Yan J., Yuan Y., Mu R., Shang H., Guan Y. // J. Biosci. 2014. V. 39. P. 795–804.
- Diafa S., Hollenstein M. // Molecules. 2015. V. 14. P. 16643–16671.
- Gawande B.N., Rohloff J.C., Carter J.D., von Carlowitz I., Zhang C., Schneider D.J., Janjic N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. P. 2898–2903.
- Kuwahara M., Hososhima S., Takahata Y., Kitagata R., Shoji A., Hanawa K., Ozaki A.N., Ozaki H., Sawai H. // Nucleic Acids Res Supp. 2003. V. 3. P. 37–38.
- Shershov V.E., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Polyakov S.A., Stomahin A.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // J. Fluoresc. 2017. V. 27. P. 2001–2016.
- Zasedateleva O.A., Vasiliskov V.A., Surzhikov S.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Guseinov T.O., Smirnov I.P., Yurasov R.A., Spitsyn M.A., Chudinov A.V. // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. e73.
- Giller G., Tassara T., Angerer B., Muhlegger K., Amacker M., Winter H. // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. P. 2630–2635.
- Kuwahara M., Nagashima J., Hasegawa M., Tamura T., Kitagata R., HanaWa K., Hasoshima S., Kasamatsu T., Ozaki H., Sawai H. // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34. P. 5383–5394.
- Лапа С.А., Волкова О.С., Спицын М.А., Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Гусейнов Т.О., Заседателев А.С., Чудинов А.В. // Биоорган. химия. 2019. Т. 45. С. 392– 402. [Lapa S.A., Volkova O.S., Spitsyn M.A., Shershov V.E.,

Kuznetsova V.E., Guseinov T.O., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. V. 45. P. 392–402.]

17. Гусейнов Т.О., Кузнецова В.Е., Шершов В.Е., Спицын М.А., Лапа С.А., Заседателев А.С., Чудинов А.В. // Биоорган. химия. 2018. Т. 44. С. 233–237. [Guseinov T.O., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Spitsyn M.A., Lapa S.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. V. 44. P. 184–187.]

 Mikhailovich V., Lapa S., Gryadunov D., Sobolev A., Strizhkov B., Chernyh N., Skotnikova O., Irtuganova O., Moroz A., Litvinov V., Vladimirskii M., Perelman M., Chernousova L., Erokhin V., Zasedatelev A., Mirzabekov A. // J. Clin. Microbiol. 2001. V. 39. P. 2531–2540.

Simultaneous Use of Cy5-Modified Derivatives of Deoxyuridine and Deoxycytidine in PCR

S. A. Lapa^{*, #}, T. O. Guseinov^{*}, A. S. Pavlov^{*},

V. E. Shershov*, V. E. Kuznetsova*, A. S. Zasedatelev*, and A. V. Chudinov*

[#]*Phone:* +7(495) 135-98-00; fax: +7(495) 135-14-05; e-mail: lapa@biochip.ru

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

The features of simultaneous incorporation of modified Cy5-deoxyuridines (C5-dU) and deoxycytidines (Cy5-dC) into the growing DNA chain in PCR with Taq DNA polymerase were studied. Studies were carried out for pairwise incorporation of nucleotides modified with fluorophores having a total positive, neutral and negative charge. The proportion of modified deoxynucleoside triphosphates (Cy5-dUTP and Cy5-dCTP) to natural analogues (dTTP and dCTP) was varied from 0 to 100% of each in the reaction, i.e. to complete substitution. The comparison with the individual incorporation of the corresponding modified derivatives was carried out. Pairs (Cy5-dU + Cy5-dC) were used to amplify fragments of bacterial genomes of 126, 283 and 370 base pairs. Increasing the length of the amplified DNA fragment reduced the yield of the product when using Cy5-modified nucleotides under selected amplification conditions. Electronegative Cy5-dNTPs showed the least inhibitory effect on PCR, while electroneutral – provided a greater density of labels incorporation in the growing DNA chain.

Keywords: modified deoxynucleoside triphosphates, indodicarbocyanine dyes, PCR



УДК 577.151.34

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА НЕМОДИФИЦИРОВАННОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ СУЛЬФАТАЗЫ ИЗ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *Fusarium proliferatum* LE1

© 2020 г. Н. В. Колчина^{*, **}, Г. Н. Рычков^{*, **}, А. А. Кульминская^{*, **}, Ф. М. Ибатуллин^{*}, М. Г. Петухов^{*, ***}, К. С. Бобров^{*, #}

*ФГБУ "Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова научно-исследовательского центра "Курчатовский институт", Россия, 188300, Ленинградская область, Гатчина, Орлова роща, 1

курчатовский институт , Госсия, 188500, ленинграоская область, Гатчина, Орлова роща, **ΦГАОУ ВО "Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого",

Россия, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 29

***ФГБУ "Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова" Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Россия, 197758, Санкт-Петербург, поселок Песочный, ул. Ленинградская, д. 70

Поступила в редакцию 03.02.2020 г.

После доработки 27.02.2020 г. Принята к публикации 28.02.2020 г.

Сульфатазы катализируют реакцию гидролиза эфиров серной кислоты и играют ключевую роль в ряде биологических процессов как высших эукариот, так и прокариот. По литературным данным для осуществления катализа некоторым представителям этой группы ферментов требуется посттрансляционная модификация остатков серина или цистеина в активном центре в уникальную аминокислоту Сα-формилглицин. Тем не менее, подтверждено, что даже в отсутствии данной модификации некоторые сульфатазы способны катализировать реакцию гидролиза сульфоэфиров. В настоящей работе были проведены исследования структурно-функциональных особенностей активной рекомбинантной сульфатазы из мицелиального гриба *Fusarium proliferatum* LE1, содержащей в активном центре каталитический остаток цистеина, не подвергшийся модификации. Впервые была построена теоретическая атомарная модель фермента, определена структурная организация его активного центра и выявлены ключевые аминокислотные остатки, принимающие участие в связывании *n*-нитрофенил сульфата и катализирующие его гидролиз. Точечные аминокислотные замены выявленных остатков привели к инактивации фермента. В частности, мутантные формы фермента с заменой каталитического цистеина на серин и треонин, содержащие гидроксильную группу в боковой цепи, полностью утрачивали активность, что свидетельствует о непосредственном участии меркаптогруппы цистеина в реакции гидролиза.

Ключевые слова: сульфатаза, Сα-формилглицин, пост-трансляционная модификация, фермент-субстратный комплекс

DOI: 10.31857/S0132342320040132

введение

Сульфатазы (КФ 3.1.6.-) представляют собой широко распространенный в природе класс гидролаз, катализирующих реакцию гидролиза различных эфиров серной кислоты, таких как стероиды, гормоны, а также различные гликоконъюгаты. Данная группа ферментов обнаружена во множестве микроорганизмов, в растениях, а также в большинстве животных и человеческих тканей [1]. У человека было идентифицировано большое количество сульфатаз, играющих ключевые роли в таких биологических процессах как синтез гормонов, деградацию гликозаминогликанов и гликолипидов, репродуктивные процессы, развитие костей и хрящей и др. [2]. Нарушение их функций связано с рядом заболеваний, включающих множественную сульфатазную недостаточность, Х-связанный ихтиозис и др. [3, 4]. Микробные сульфатазы изучены менее подробно [5]. Известно, что сульфатазы микроорганизмов участвуют в процессах утилизации альтернативных источников серы и экспрессируются в условиях недостаточности неорганического сульфата [6]. Сульфатазы

Сокращения: FGly — С α -формилглицин; *Fp*.Sulf-6His — рекомбинантная сульфатаза из *Fusarium proliferatum* LE1; *p*NPS — *n*-нитрофенил сульфат; SmCS — сульфатаза из *Sinorhizobium meliloti*; HsS — сульфатаза из *Homo sapiens*; BtS — сульфатаза из *Bacteroides thetaiotaomicron*; МД — молекулярная динамика.

[#]Автор для связи: (эл. почта: bobrov_ks@pnpi.nrcki.ru).

на поверхности клеток некоторых патогенных микроорганизмов участвуют в процессе взаимодействия "хозяин-патоген" [7]. Помимо этого, данные ферменты играют важную роль в росте и морфологии грибов рода *Fusarium*, что делает их потенциальной мишенью для разработки новых фунгицидов [8].

Современная классификация сульфатаз основана на сравнении аминокислотных последовательностей и разделяет ферменты на четыре семейства [9]. При этом почти 90% известных сульфатаз являются представителями семейства S1 [10]. Ферменты, входящие в это семейство, содержат в активном центре уникальный аминокислотный остаток Сα-формилглицин (FGly), образующийся в результате пост-трансляционной модификации серина или цистеина в консервативном мотиве (C/S)XPXR на N-конце белка [11, 12]. Считается, что наличие FGly строго необходимо для проявления сульфатазной активности, а ферменты с немодифицированным каталитическим остатком образуют с субстратом ковалентный комплекс, в дальнейшем негидролизуемый по традиционной схеме [13–16]. Далее под модифицированным ферментом дикого типа мы будем подразумевать фермент без аминокислотных замен, содержащий каталитический остаток FGly, соответственно немодифицированным будем называть фермент, содержащий каталитический остаток Cys или Ser.

Тем не менее, в последнее время стали появляться работы, доказывающие, что некоторые ферменты, не подвергшиеся пост-трансляционной модификации каталитического остатка, все-таки способны катализировать гидролиз сульфатированных соединений. Так, отсутствие FGly в рекомбинантной холинсульфатазе из Ensifer (Sinorhizobium) meliloti было подтверждено методом массспектрометрии, но при этом фермент проявлял детектируемую активность в гидролизе холин-, *п*-нитрофенил- и метилумбеллиферил-сульфатов [17]. Аналогично, ранее охарактеризованная нами рекомбинантная немодифицированная сульфатаза из мицелиального гриба Fusarium proliferatum LE1 также катализировала реакцию гидролиза *п*-нитрофенил сульфата (*p*NPS) [18].

Опубликованные результаты указывают на необходимость дальнейшего тщательного изучения структурных особенностей, обеспечивающих каталитическую активность как модифицированных, так и немодифицированных сульфатаз. В настоящей работе мы провели исследование структурной организации активного центра рекомбинантной немодифицированной сульфатазы из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1 для выявления каталитических остатков, участвующих в катализе гидролиза модельного субстрата *p*NPS, методами молекулярного моделирования и белковой инженерии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ первичной структуры и субстратная специфичность

В работе использовали созданную нами ранее систему экспрессии рекомбинантной сульфатазы из мицелиального гриба F. proliferatum LE1 (F.p.Sulf-6His) [18]. Так, было установлено, что данный фермент проявляет гидролитическую активность в отношении таких субстратов, как pNPS (удельная активность 2.3×10^{-2} ед. акт./мг белка) и п-нитрофенил фосфат (удельная активность 3.8×10^{-4} ед. акт./мг белка). При этом отсутствие пост-трансляционной модификации каталитического цистеина в FGlv было подтверждено методом масс-спектрометрии [18]. Анализ аминокислотной последовательности *F.p.*Sulf-6His показал, что изучаемый белок относится к семейству S1 сульфатаз, подсемейству S1 S12 (холинсульфатазы) [10]. В настоящей работе было проведено исследование гидролитической активности F.p.Sulf-6His в отношении его предполагаемого субстрата холинсульфата.

Анализ реакционной смеси показал отсутствие в ней холина, являющегося непосредственным продуктом реакции гидролиза холинсульфата. Следовательно, можно заключить, что *F.p.*Sulf-6His не катализирует реакцию гидролиза холинсульфата.

Молекулярное моделирование

С помощью методов молекулярного моделирования построили атомарные модели *F.p.* Sulf-6His, взяв за основу пространственные структуры сульфатаз с гомологичными аминокислотными последовательностями из трех организмов: *Sinorhizobium meliloti* (SmCS, идентичность последовательности 44%, PDB код: 4UG4, рис. 1*a*), *Bacteroides thetaiotaomicron* (BtS, идентичность последовательности 32%, PDB код: 5G2V, рис. 1*б*) и *Homo sapiens* (HsS, идентичность последовательности 33%, PDB код: 4MHX, рис. 1*в*).

Наиболее полное совпадение модели и шаблона по аминокислотному составу, ходу полипептидной цепи и пространственному расположению аминокислот активного центра наблюдается только для структуры *F.p.*Sulf-6His, построенной на основе сульфатазы SmCS (рис. 1*a*). Поэтому именно эту модель использовали для исследования фермент-субстратного комплекса *F.p.*Sulf-6His с *p*NPS. В свою очередь аминокислотный состав активных центров модели и шаблона существенным образом отличается для модели, построенной, как на основе BtS, так и на основе HsS. Из-за разницы в количестве аминокислотных остатков между моделью и шаблоном отличается также ход полипептидной цепи на участках активного центра, затрагивающих остатки 254-265 и 441-449 BtS (рис. 1 δ) и в еще большей степени на участках 124-126, 138-142, 278-288, 388-437 HsS (рис. 1в).

Релаксация сконструированной модели белка *F.p.* Sulf-6His методом молекулярной динамики (МД) в водном окружении в течение 150 нс не выявила нестабильности третичной структуры глобулы белка (рис. 2). Усредненная величина среднеквадратичных флуктуаций атомов С, Сα, N основной цепи составляет 0.89 ± 0.55Å. Подвижностью выше средней обладали лишь участки на N-конце (5–13, 18–26) и на C-конце (515–557) белка, информация о которых не содержалась в структурном шаблоне SmCS а также участки петель и концевые участки альфа-спиралей, не принимающие участия в формировании активного центра (43-51, 157-161, 175-181, 234-249, 265-269, 445-475, 492-507) (рис. 2а и 2б). Среди наиболее заселенных конформаций белка, найденных методами кластеризации (рис. 2в), была выбрана конформация с открытым входом в активный центр. объем которого был достаточен для размещения субстрата pNPS. N- и С-концы фермента не загораживают вход в активный центр, располагаясь на расстоянии более 25 Å от него.

Возможные варианты связывания pNPS в активном центре белка *F.p.*Sulf-6His установили с помощью методов докинга с последующей проверкой стабильности комплекса методом МД в водном окружении. Ранее масс-спектрометрический анализ показал, что в отличие от SmCS на месте каталитического FGly в ферменте F.p. Sulf-6His находится остаток цистеина в положении 77 [18]. Ближайшими аминокислотными остатками в радиусе 4 Å от *p*NPS являются: D36, C77, A78, R81, К125, М126, Н127, Ү145, D314, Н315 и К327 (рис. 3). Аминокислотные остатки D36, D314, H315 координируют ион марганца, а остаток R81 для этого правильным образом располагает в пространстве остаток D314, образуя с ним водородную связь. Рисунок 4 демонстрирует наблюдаемое в ходе МД изменение расстояний между атомами сульфатной группы pNPS и взаимодействующими с ней ключевыми атомами в структуре F.p.Sulf-6His: S-SγC77, O1-SγC77, O3-NζK327, O4-Mn²⁺. Haчиная с 21-ой нс, когда субстрат pNPS изменил исходное положение в активном центре фермента, структура комплекса *F.p.*Sulf-6His-*p*NPS оставалась стабильной до конца траектории; среднеквадратичные флуктуации атомов *pNPS* составили 0.82 Å. Средние рассчитанные расстояния равны $3.90 \pm 0.19, \, 3.31 \pm 0.24, \, 1.96 \pm 0.05$ и 3.30 ± 0.50 Å для пар атомов S-SүC77, O1-SүC77, O3-NζK327, О4-Mn²⁺ соответственно. Атом кислорода О4 сульфогруппы pNPS прочно удерживается ионом марганца на одном расстоянии. Атом ОЗ образует во-

(б)



Рис. 1. Пространственная структура сульфатаз из S. melliloti (SmCS, идентичность последовательности 44%, PDB код: 4UG4) (a), B. thetaiotaomicron (BtS, идентичность последовательности 32%, PDB код: 5G2V) (б) и H. sapiens (HsS, идентичность последовательности 33%, РDB код: 4МНХ) (в). Салатовым цветом окрашена модель F.p.Sulf-6His, построенная по соответствующему структурному шаблону, темно-зеленым - фермент SmCS, синим - BtS, бирюзовым -HsS. Желтой сферой обозначен ион металла в активном центре. Красным цветом выделены участки третичной структуры ферментов относящиеся к активному центру, и отличающиеся в модели и структурном шаблоне.

(a)



Рис. 2. Подвижность третичной структуры модели белка *F.p.*Sulf-6His в ходе МД. (*a*) Среднеквадратичные флуктуации (СКВФ) основной цепи аминокислотных остатков. Зеленой пунктирной линией обозначена средняя величина СКВФ. (*б*) Утолщения полипептидной цепи пропорциональны величине СКВФ этих участков цепи. (*в*) Пространственное совмещение медианных структур из пяти кластеров, полученных по результатам анализа траектории МД.

дородную связь с аминогруппой лизина 327, но расстояние между донором и акцептором водородной связи меняется в ходе МД из-за подвижности длинной боковой цепи лизина. В непосредственной близости от S γ C77 находится атом кислорода O1, соединяющий сульфатную и нитрофенольную группы *p*NPS. 4% времени атом S γ C77 находится в плотном ван-дер-ваальсовом контакте с атомом серы сульфогруппы *p*NPS, когда расстояния между ними не превышает расстояния атаки 3.6 Å. При этом минимальное наблюдаемое расстояние S–S γ C77 равняется 3.35 Å.

Построенная атомарная модель комплекса *F.p.*Sulf-6His-*p*NPS позволила сделать предположения о роли отдельных аминокислотных остатков активного центра фермента и предложить одиночные аминокислотные замены для проверки этих предположений. Необходимо было выяснить, действительно ли остаток С77 участвует в реакции гидролиза *p*NPS и важно ли для катализа наличие его меркаптогруппы, или же ее роль может выполнять гидроксильная группа. Для проверки первого предположения решили сделать аминокислотную замену С77А; для проверки второго – рекомендовали провести замены C77S и С77Т. Остатки серина и треонина по химическому составу боковых цепей напоминают цистеин с той лишь разницей, что тиольная группа заменена на гидроксильную.

Для определения других ключевых остатков в активном центре фермента F.p.Sulf-6His, способных участвовать в связывании субстрата и оказывать влияние на ход каталитической реакции, предложили аминокислотные замены К327А, K125A, H127A, R81A. По аналогии с описанным механизмом действия сульфатазы SmCS [19] аминокислотный остаток К327 может отвечать за протонирование уходящей группы при гидролизе сульфатных эфиров, однако в построенном нами комплексе F.p.Sulf-6His-pNPS остатки K125 и Н127 располагаются на удалении от сульфогруппы (расстояние от атома S pNPS до атома N остатка K125 составляет 5.8 Å, от атома S pNPS до атома N остатка H127 – 8.9 Å), ближе ко входу в активный центр и взаимодействуют с уходящей группой субстрата.

Анализ гидролитической активности мутантных форм F.p.Sulf-6His

Нами были получены, выделены и очищены мутантные формы белка *F.p.*Sulf-6His, содержащие предложенные аминокислотные замены. Уровень экспрессии мутантных форм соответствовал уровню экспрессии белка дикого типа (данные не показаны). При этом ни один из выделенных ферментов не продемонстрировал детектируемой сульфатазной активности.



Рис. 3. (*a*) Расположение субстрата *p*NPS в активном центре *Fp*.Sulf-6His, полученное методами молекулярного моделирования. (*б*) Диаграмма взаимодействия аминокислотных остатков *F.p.*Sulf-6His с *p*NPS. Зеленым цветом показана гидрофобная область, голубым затенением показаны акцепторы водородной связи, серыми дугами показана поверхность, доступная растворителю.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты указывают на то, что катализ реакции гидролиза pNPS ферментами с каталитическим FGly и немодифицированной сульфатазой Fp.Sulf-6His происходит в том же активном центре. Так, замена обсуждаемых аминокислот в SmCS с модифицированным каталитическим остатком приводит к снижению активности фермента на 3–4 порядка [19]. Вероятно, данное снижение происходит и в случае немодифицированной Fp.Sulf-6His, но, поскольку исходная активность фермента невысока, то гидролитическую активность мутантных форм оказалось невозможно детектировать используемыми в работе

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 4 2020

методами, так как снижение данной величины на три порядка приведет к тому, что измеряемые величины оптической плотности реакционной смеси станут соизмеримы с погрешностью спектрофотометра. Увеличение времени реакции в нашем случае также не способствовало детекции гидролитической активности по причине низкой стабильности исследуемого фермента. При этом инактивация мутантной формы *F.p.*Sulf-6His C77A указывает на участие немодифицированного цистеина в реакции гидролиза сульфоэфиров.

С учетом высокой гомологии активных центров белков *F.p.*Sulf-6His и SmCS и результатов молекулярного моделирования, мы предположи-



Рис. 4. Изменение расстояния между атомами сульфатной группы *p*NPS и взаимодействующими с ними атомами белка.

ли, что арилсульфатаза *F.p.*Sulf-6His катализирует реакцию гидролиза pNPS путем атаки SH-группы цистеина C77 на атом серы pNPS. Такой атаке способствует электрон-акцепторное влияние нитро-группы, увеличивающей дробный отрицательный заряд на кислородном атоме нитрофенильного остатка, что облегчает разрыв связи между ним и атомом серы сульфата. Дробный отрицательный заряд на нитрофенильном атоме кислорода может также способствовать частичному депротонированию SH-группы цистеина C77. что также должно увеличивать нуклеофильность меркаптогруппы, а следовательно, ускорять реакцию замещения остатка нитрофенола на остаток цистеина. В результате остаток цистеина, предположительно, превращается в тиосульфатное производное, в котором остаток сульфата присоединен к сере посредством S-S связи. Активирующее

влияние нитрофенильной группы не вызывает сомнения, так как мы показали, что фермент не способен гидролизовать алкилсульфаты, в частности, холинсульфат. Однако остается вопрос, что происходит с ферментом после того, как SH-группа цистеина С77 превращается в остаток тиосульфата. S-Алкилтиосульфаты или, так называемые, соли Бунтэ хорошо известны в органической химии [20]. Кислотный гидролиз таких производных приводит к отщеплению сульфата и высвобождению алкил-тиолов, что является одним из препаративных способов получения последних. Однако обычно такой гидролиз протекает в достаточно жестких условиях, к примеру, путем кипячения в кислой среде в течение нескольких часов. Основания также способны гидролизовать алкилтиосульфаты, но известно лишь, что реакция протекает по сложному механизму. Тем не менее, поскольку в результате гидролиза pNPS не происходит инактивации фермента, это, вероятно, означает, что тиосульфатное производное цистеина 77 каким-то образом способно гидролизоваться в физиологических условиях, высвобождая исходную SH-группу и переводя, таким образом, фермент в активную форму.

Необходимо отметить, что замена каталитического цистеина на серин инактивировала *F.p.*Sulf-6His. Известно, что оба этих аминокислотных остатка в сульфатазах могут модифицироваться в FGly [2, 21]. Однако гидролитическую активность проявлял лишь *F.p.*Sulf-6His с цистеином в активном центре. Мутантная форма фермента, в которой каталитический цистеин был заменен на треонин, также не проявила детектируемой гидролитической активности, указывая на необходимость участия меркаптогруппы цистеина в реакции гидролиза, катализируемой *F.p.*Sulf-6His.

В литературе описываются случаи наличия сульфатазной активности у немодифицированных ферментов, содержащих в активном центре как цистеин, так и серин. Так, гидролиз сульфоэфиров, помимо F.p.Sulf-6His, были способны осуществлять немодифицированная сульфатаза из S. meliloti [17], в активном центре которой находится цистеин, и сульфатаза из Pseudomonas aeruginosa, в активный центр которой методом сайт-направленного мутагенеза был введен серин [13]. Однако в работе Williams с соавт. было показано, что реакция распада фермент-сульфатного комплекса (переходного состояния) предположительно идет по механизму элиминирования Е2, а не нуклеофильного замещения SN2 [16]. Для протекания данной реакции необходимо наличие геминальной гидроксигруппы у каталитической аминокислоты. Именно ее отсутствием авторы объясняют невозможность распада ковалентного комплекса немодифицированных сульфатаз с серином в активном центре и сульфатной группы. Наличие же гидролитической активности у сульфатазы из

P. aeruginosa Williams с соавт. объяснили загрязнением мутантной формы белка диким типом фермента. Аналогично было объяснено наличие сульфатазной активности у C69S мутантной формы сульфатазы из *H. sapiens* [14]. Также было показано, что две сульфатазы из *B. thetaiotaomicron*, содержащие серин в активном центре, являются неактивными [22].

Известно, что как серин, так и цистеин могут непосредственно участвовать в катализе, осуществляемыми гидролазами [23]. Типичными представителями таких ферментов являются сериновые и цистеиновые протеазы. Такие ферменты имеют дополнительные аминокислоты, необходимые для активации и депротонирования гидроксильной (серин) или тиольной (цистеин) группы. В целом, считается, что снижение рКа остатка цистеина вызывают положительно заряженные группы соседних аминокислот и/или усиление электростатических взаимодействий между этой группой и атомом серы в результате увеличения электронной плотности на атоме серы цистеина [24]. При этом тиольная группа является более сильным нуклеофилом, чем гидроксильная группа, и для ее активации может использоваться более короткая цепь переноса протонов [23].

Таким образом, можно сделать следующие предположения. Субстрат *p*NPS связывается как с модифицированной, так и с немодифицированной сульфатазой в одном и том же активном центре. В результате данного связывания в обоих случаях происходит образование ковалентного фермент-сульфатного комплекса. Однако, в то время как комплекс субстрата с модифицированной сульфатазой расщепляется по энергетически выгодному механизму элиминации Е2, комплекс субстрата с немодифицированным ферментом по данному механизму расщепляться не может ввиду отсутствия геминальной гидроксильной группы у каталитической аминокислоты. Поэтому данная стадия может протекать по альтернативному механизму нуклеофильного замещения SN2, что требует депротонирования каталитической аминокислоты. Цепь переноса протонов, имеющаяся в активном центре F.p. Sulf-6His, вероятно, недостаточно длинная, чтобы депротонировать гидроксильную группу серина или треонина, поэтому мутантные формы фермента С77S и С77T не проявляют гидролитической активности. При этом депротонирование тиольной группы цистеина по этой цепи происходит, что позволяет протекать реакции гидролиза фермент-субстратного комплекса с регенерацией фермента. Стоит отметить, что заряды боковых групп аминокислотных остатков, окружающих каталитический цистеин и влияющих на его свойства, зависят от кислотности среды [24]. Наши предыдущие исследования показали, что F.p.Sulf-6His обладает активностью в достаточно узком диапазоне рН [18]. Вероятно,

при значениях pH около 6 зарядовое состояние аминокислотных остатков вблизи цистеина наиболее благоприятно для увеличения его реакционноспособности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе мы впервые построили теоретическую атомарную модель немодифицированного фермента *F.p.*Sulf-6His. Методами молекулярного моделирования и белковой инженерии показали, что связывание субстрата происходит в активном центре, как и в случае модифицированного белка, и выявили ключевые аминокислотные остатки активного центра, принимающие участие в связывании и гидролизе субстрата *p*NPS. При этом тиольная группа C77, не подвергшаяся пост-трансляционной модификации в FGly, принимает непосредственное участие в катализе гидролиза сульфоэфиров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы

В работе использовали реактивы производства компании Sigma-Aldrich (США), если не указано иное.

Субстрат *p*NPS был синтезирован согласно опубликованному протоколу [25]; субстрат холинсульфат был синтезирован из холинбромида (Chemapol, Чехословакия) аналогично синтезу β-аминоэтилсерной кислоты [26].

ПЦР проводили с использованием высокоточной Q5 полимеразы (NEB). Очистка ДНК из реакционных смесей проводилась с использованием набора реактивов Cleanup Standard (Евроген, Россия). Ферменты, используемые для работ по молекулярной биологии, были производства Thermo Scientific (Германия) или СибЭнзим (Россия). Электропоратор MicroPulser и 0.2 см кюветы были производства компании Bio-Rad (США).

Молекулярное моделирование

В базах данных открытого доступа информация о пространственном строении Fp.Sulf-6His отсутствует. Поиск ферментов, гомологичных Fp.Sulf-6His, провели в Базе данных структур белков (PDB), используя интернет-сервер SWISS-MODEL [27]. Атомарные модели Fp.Sulf-6His построили в программе Molsoft ICM-Pro [28], взяв в качестве структурных шаблонов сульфатазы, обладающие наибольшей схожестью пептидной последовательности с исследуемым ферментом (коды PDB: 4UG4, 4MHX, 5G2V). Координаты атомов главной цепи Fp.Sulf-6His задавались положением С α атомов гомологичного белка, для всех неидентичных остатков проводился поиск низкоэнергетических конформаций методом глобальной оптимизации с учетом их аминокислотного окружения.

Построенную атомарную модель Fp.Sulf-6His релаксировали методом МД в явно заданном водном растворителе с периодическими граничными условиями, по протоколу, описанному ниже. Кластеризацию структур F.p.Sulf-6His, наблюдаемых в ходе МД, проводили с помощью иерархического агломеративного алгоритма, задав ограничение на расстояние между кластерами равным 2. Для построения комплекса F.p.Sulf-6His—pNPS выбрали медианную структуру фермента с открытым входом в активный центр, чей объем был достаточен для размещения pNPS.

Атомарную модель pNPS построили в программе Molsoft ICM-Pro и оптимизировали ее геометрию с использованием силового поля MMFF [29]. Процедуру "гибкого" докинга проводили по протоколу, подробно описанному авторами программы [28, 30, 31]. Докинг pNPS запускали трижды из различных начальных положений в активном центре и конформаций. Так как в процессе докинга для поиска возможных конформаций лиганда используются метод псевдо-броуновского перемещения лиганда совместно со смещено-вероятностным методом Монте-Карло [31], то трех запусков вполне достаточно для относительно полного исследования конформационного пространства субстрата в изучаемом сайте связывания.

Стабильность обнаруженного в результате докинга комплекса *F.p.*Sulf-6His—*p*NPS, обладавшего наименьшей величиной оценочной функции, исследовали методом МД по протоколу, описанному ниже.

Протокол молекулярной динамики

Расчеты МД и обработку траекторий проводили в программном пакете AMBER 16 [32], используя силовые поля ff14 для белка и GAFF2 для pNPS. Исследуемые модели F.p.Sulf-6His и его комплекса с pNPS помещали в октаэдрический водный бокс, размеры которого выбрали таким образом, чтобы толщина водного слоя вокруг белка была не менее 12 Å. Молекулы воды были представлены моделью TIP3P; параметры для одновалентных ионов – Li, Song и Merz [33], для двухвалентых ионов - Li и Merz [34]. В систему добавляли 18 ионов Na⁺, для нейтрализации заряда. МД проводили по стандартному протоколу, включаюшему: 1) двухстадийную минимизацию, затрагивающую сначала только молекулы растворителя, а затем и всю моделируемую систему (белок, субстрат и растворитель); 2) постепенный нагрев системы в течение 100 пс с наложением ограничений на подвижность атомов белка; 3) уравновешивание системы в течение 1 нс; 4) запуск продуктивной молекулярной динамики системы продолжительностью 150 нс для релаксации модели *F.p.*Sulf-6His и 100 нс для исследования комплекса *F.p.*Sulf-6His—*p*NPS.

Шаг интегрирования МД равнялся 2 фс. Для удержания величин длин ковалентных связей и величин валентных углов использовали алгоритм SHAKE. Температура системы поддерживалась на уровне 300 К с помощью динамики Ланжевена. Для поддержания давления в системе равного 1 атм использовали баростат Берендсена с константой времени взаимодействия равной 2 пс. Дальнодействующие взаимодействия учитывали методом PME (particle mesh Ewald — суммирование Эвальда по пространственной сетке частиц). Расстояние отсечки невалентных взаимодействий атомов установили равным 10 Å.

Определение гидролитической активности белков

Гидролитическая активность ферментных препаратов с использованием в качестве субстрата *p*NPS определялась по ранее опубликованному стандартному протоколу [18]. Единицу активности определяли как количество фермента, гидролизующее 1 мкмоль субстрата *p*NPS в минуту.

Исследование реакции гидролиза холин сульфата ферментом дикого типа в стандартных условиях проводилось спектрофотометрически. Для определения гидролитической активности фермента к реакционной смеси добавляли 1 мл реактива, содержащего 0.1 г/л холиноксидазы, 0.1 г/л пероксидазы хрена, 0.3 М трис-фосфатный буфер (pH 7), 40% глицерина и 0.1 г/л о-дианизидина. После инкубации смеси при 37°С в течение 30 минут к ней добавляли 2 мл 5 М HCl и определяли оптическую плотность раствора при длине волны 525 нм. Количество холина в реакционной смеси определяли по калибровочному графику, полученному для растворов холин бромида с разной концентрацией. Единицу активности определяли как количество фермента, гидролизующее 1 мкмоль субстрата холин сульфата в минуту.

Сайт-направленный мутагенез и выделение белков

Внесение предложенных мутаций в ген белка *F.p.*Sulf-6His проводили с использованием плазмиды pPIC3-*F.p.*Sulf-6His [18]. Дизайн праймеров осуществляли при помощи он-лайн сервиса NEBaseChanger® [35]. Продукты ПЦР, полученные для каждой пары праймеров, последовательно обрабатывали ферментами DpnI, T4 полинуклеотидкиназой и T4-лигазой, согласно протоколам производителей. Конечные реакционные смеси трансформировали в бактериальные клетки *Escherichia coli* DH5 α методом электропорации. Наличие точечных мутаций в гене белка *F.p.*Sulf-6His подтверждали секвенированием. Плазмидную ДНК, несущую гены белка *F.p.*Sulf-6His с требуемыми мутациями, выделяли, обрабатывали рестриктазой Eco147I и трансформировали в клетки *Pichia pastoris* GS115 методом электропорации согласно протоколу компании Invitrogen. Экспрессию, выделение и очистку белков *Fp*.Sulf-6His, содержащих точечные мутации, осуществляли по протоколу, опубликованному ранее [18]. Гомогенность полученных белковых препаратов проверяли методом ПААГ-электрофореза.

Сульфатазную активность полученных белковых препаратов проверяли с использованием *p*NPS в качестве субстрата.

БЛАГОДАРНОСТИ

Секвенирование образцов ДНК проводилось с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ "Развитие молекулярных и клеточных технологий".

Молекулярная динамика проводилась с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного центра Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (www.scc.spbstu.ru).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работы по исследованию проводились при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-34-00143).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Stressler T., Seitl I., Kuhn A., Fischer L. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. № 21. P. 9053–9067.
- Hanson S.R., Best M.D., Wong C.-H. // Angew. Chem. Int. Ed. 2004. V. 43. № 43. P. 5736–5763.
- 3. *Diez-Roux G., Ballabio A.* // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2005. V. 6. № 1. P. 355–379.
- 4. Rižner T.L. // Front. Pharmacol. 2016. V. 7. P. 30.
- 5. Швецова С.В., Кульминская А.А. // Вестник Московского Университета. 2018. Т. 59. № 4. С. 243–256.
- 6. *Toesch M., Schober M., Faber K.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. № 4. P. 1485–1496.
- Hossain Md.M., Kawarabayasi Y., Kimura M., Kakuta Y. // J. Biochem. (Tokyo). 2009. V. 146. № 6. P. 767–769.
- 8. *Markham P., Robson G.D., Bainbridge B.W., Trinci A.P. //* FEMS Microbiol. Rev. 1993. V. 10. № 3–4. P. 287–300.
- Barbeyron T., Brillet-Guéguen L., Carré W., Carrière C., Caron C., Czjzek M., Hoebeke M., Michel G. // PLoS One. 2016. V. 11. № 10. P. e0164846.
- 10. http://abims.sb-roscoff.fr/sulfatlas/index.html.
 - БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 4 2020

- Miech C., Dierks T., Selmer T., von Figura K., Schmidt B. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 9. P. 4835–4837.
- 12. Schmidt B., Selmer T., Ingendoh A., von Figura K. // Cell. 1995. V. 82. № 2. P. 271–278.
- Olguin L.F., Askew S.E., O'Donoghue A.C., Hollfelder F. // J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130. № 49. P. 16547–16555.
- 14. Recksiek M., Selmer T., Dierks T., Schmidt B., von Figura K. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 11. P. 6096– 6103.
- Stressler T., Reichenberger K., Glück C., Leptihn S., Pfannstiel J., Swietalski P., Kuhn A., Seitl I., Fischer L. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 102. № 6. P. 2709– 2721.
- Williams S.J., Denehy E., Krenske E.H. // J. Org. Chem. 2014. V. 79. № 5. P. 1995–2005.
- Sánchez-Romero J.J., Olguin L.F. // Biochem. Biophys. Rep. 2015. V. 3. P. 161–168.
- Korban S.A., Bobrov K.S., Maynskova M.A., Naryzhny S.N., Vlasova O.L., Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A. // Protein Eng. Des. Sel. 2017. V. 30. № 7. P. 477-488.
- van Loo B., Schober M., Valkov E., Heberlein M., Bornberg-Bauer E., Faber K., Hyvönen M., Hollfelder F. // J. Mol. Biol. 2018. V. 430. № 7. P. 1004–1023.
- 20. *Distler H.* // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1967. V. 6. № 6. P. 544–553.
- Dierks T., Miech C., Hummerjohann J., Schmidt B., Kertesz M.A., von Figura K. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 40. P. 25560–25564.
- Cartmell A., Lowe E.C., Baslé A., Firbank S.J., Ndeh D.A., Murray H., Terrapon N., Lombard V., Henrissat B., Turnbull J.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2017. V. 114. № 27. P. 7037–7042.
- 23. Варфоломеев С.Д., Гариев И.А., Упоров И.В. // Успехи химии. 2005. Т. 74. № 1. С. 67-83.
- 24. *Nagahara N.* // Journal of Amino Acids. 2010. V. 2011. P. 709404.
- 25. *Huggins C., Smith D.R.* // J. Biol. Chem. 1947. V. 170. № 1. P. 391–398.
- Лазурьевский Г.В., Терентьева И.В., Шамшурин А.А. Практические работы по химии природных соединений. Москва. Высшая школа, 2-е изд. 1966. 335 с.
- Biasini M., Bienert S., Waterhouse A., Arnold K., Studer G., Schmidt T., Kiefer F., Gallo Cassarino T., Bertoni M., Bordoli L. // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42. Web Server issue. P. W252–W258.
- 28. Abagyan R., Totrov M., Kuznetsov D. // J. Comput. Chem. 1994. V. 15. № 5. P. 488–506.
- 29. *Halgren T.A.* // J. Comput. Chem. 1996. V. 17. № 5–6. P. 490–519.
- Fernández-Recio J., Totrov M., Abagyan R. // Proteins. 2003. V. 52. № 1. P. 113–117.
- Totrov M., Abagyan R. // Proteins. 1997. V. Suppl. 1. P. 215–220.
- 32. *Salomon-Ferrer R., Case D.A., Walker R.C. //* WIREs Comput. Mol. Sci. 2013. V. 3. № 2. P. 198–210.
- 33. *Li P., Song L.F., Merz K.M.* // J. Chem. Theory Comput. 2015. V. 11. № 4. P. 1645–1657.
- Li P., Song L.F., Merz K.M. // J. Phys. Chem. B. 2015. V. 119. № 3. P. 883–895.
- 35. http://nebasechanger.neb.com/.

КОЛЧИНА и др.

Structural Organization of the Active Center of Unmodified Recombinant Sulfatase from the Mycelial Fungi *Fusarium proliferatum* LE1

N. V. Kolchina^{*, **}, G. N. Rychkov^{*, **}, A. A. Kulminskaya^{*, **}, F. M. Ibatullin^{*}, M. G. Petukhov^{*, ***}, and K. S. Bobrov^{*, #}

[#]E-mail: bobrov_ks@pnpi.nrcki.ru

*Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC "Kurchatov Institute", mkr. Orlova roshcha 1, Gatchina, Leningradskaya oblast, 188300 Russia

** Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Polytechnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia

*** Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies named by academician A.M. Granov,

pos. Pesochniy, Leningradskaya 70, St. Petersburg, 197758 Russia

Sulfatases catalyze the hydrolysis of sulfuric acid esters and play a key role in a number of biological processes of both higher eukaryotes and prokaryotes. According to literature data, for the implementation of catalysis, some representatives of this group of enzymes require post-translational modification of serine or cysteine residues in the active center into the unique amino acid C α -formylglycine. Nevertheless, it is confirmed that even in the absence of this modification, some sulfatases are capable of catalyzing the hydrolysis of sulfoesters. In this work, we studied the structural and functional features of active recombinant sulfatase from the mycelial fungus *Fusarium proliferatum* LE1, which contains a cysteine residue in the active center. A theoretical atomic model of the enzyme was first constructed, the structural organization of its active center was determined, and key amino acid residues involved in the binding of *p*-nitrophenyl sulfate and in the reaction of its hydrolysis were identified. Point amino acid substitutions of the identified residues led to inactivation of the enzyme. In particular, mutant forms of the enzyme with the replacement of catalytic cysteine by serine and threonine containing a hydroxyl group in the side chain completely lost activity, which indicates the direct participation of the mercapto group of cysteine in the hydrolysis reaction.

Keywords: sulfatase, $C\alpha$ -formylglycine, post-translational modification, enzyme-substrate complex



УДК 577.112.083

ПОЛУЧЕНИЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА В ФОРМАТЕ Fab-scFv НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛА К ИНТЕРФЕРОНУ БЕТА-1 ЧЕЛОВЕКА И АНТИТЕЛА К НЕR2-РЕЦЕПТОРУ

© 2020 г. А. А. Панина^{*, #}, В. А. Топорова^{*}, В. С. Рыбченко^{**}, Д. С. Балабашин^{*}, В. В. Аргентова^{**}, С. А. Якимов^{*}, О. Н. Солопова^{***, ****}, Т. К. Алиев^{**}, Д. А. Долгих^{*}, П. Г. Свешников^{***}, М. П. Кирпичников^{*, **}

*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, ул. Ленинские Горы, 1

***ОАО "Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения",

Россия, 117638, Москва, Симферопольский б-р, 8

****ФБГУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России, Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23

Поступила в редакцию 27.12.2019 г. После доработки 11.01.2020 г.

Принята к публикации 20.01.2020 г.

Создание новых средств терапии злокачественных опухолей является актуальной задачей. В настоящее время гуманизированное антитело трастузумаб считается "золотым стандартом" в комплексной терапии опухолей молочной железы с гиперэкспрессией HER2, рецептора эпидермального фактора роста человека 2. Однако в ряде случаев наблюдается резистентность к указанному препарату. Поиск новых путей терапии HER2-позитивных опухолей представляется важным направлением исследований. В настоящее время проводится целый ряд клинических исследований по применению интерферона-бета человека (ИФН-бета) в онкологии. Большинство этих исследований используют вирусные векторы, несущие ген интерферона-бета, с целью уменьшения системного действия этого цитокина. Разрабатываемый нами иммуноцитокиновый комплекс биспецифического антитела и ИФН-бета также содержит механизм ухода от системного действия ИФН-бета. Частью разработки такого комплекса является создание биспецифических антител различного формата. На основе нейтрализующего антитела B16 к ИФН-бета и антитела трастузумаб (Tz), специфичного к HER2-рецептору, нами получены различные варианты биспецифических антител в формате Fab-scFv. Показано, что полученные белки связывают и нейтрализуют ИФН-бета, также они связывают HER2-рецептор в лизатах опухолевых клеток и в виде рекомбинантного внеклеточного домена. Такие молекулы в составе иммуноцитокинового комплекса с ИФН-бета могут быть использованы в качестве средств доставки ИФН-бета к клеткам HER2-позитивных опухолей.

Ключевые слова: интерферон-бета, CHO, Fab-scFv, трастузумаб, HER2 **DOI:** 10.31857/S0132342320040211

введение

Злокачественные новообразования занимают второе место среди всех причин смерти после сер-

дечно-сосудистых заболеваний. На первом месте по распространенности у мужчин находятся опухоли органов дыхания, а у женщин – опухоли молочной железы, и значительную часть и тех, и других составляют опухоли с гиперэкспрессией рецептора эпидермального фактора роста HER2, что является показателем неблагоприятного прогноза исхода заболевания. Кроме того, HER2 может быть гиперэкспрессирован на опухолях мочевого пузыря, поджелудочной железы, яичника, матки, толстой кишки, почки, головы и шеи, желудка, пищевода и предстательной железы. Антитела к ассоциированным с опухолью поверхностным антигенам активно используются для иммунотерапии злокачественных опухолей человека, являясь более специфическими и обладая мень-

Сокращения: L – легкая цепь антитела; H – тяжелая цепь антитела; VH – вариабельный домен H-цепи; VL – вариабельный домен L-цепи; CH1 – 1-й константный домен IgG1 антитела; Fab-фрагмент – антиген-связывающий фрагмент антитела; scFv – одноцепочечные варианты антитела; HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2; ИФН-бета – интерферон-бета-1 человека; MTT – бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий; Tz – трастузумаб; PCR, ПЦР – полимеразная цепная реакция; SOE-PCR – полимеразная цепная реакция с короткими перекрывающимися концами; МПК – мононуклеары периферической крови человека.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (916) 292-76-51; эл. почта: paniann07@yandex.ru).

шим побочным эффектом, чем химиотерапевтические препараты [1]. Однако полноразмерные антитела, обладая молекулярной массой около 150 кДа, характеризуются слабой проникающей способностью в солидные опухоли в связи с замедлением диффузии через стенки сосудов. В то же время, молекулы менее 60 кДа, хорошо проникая в опухоли, обладают небольшим временем нахождения в кровотоке, не обеспечивая достаточного накопления в опухоли. Поэтому получение модифицированных вариантов антител со средним размером молекул с хорошей проникающей способностью и достаточным временем жизни в кровотоке, является перспективным направлением [2]. Производные антител, лишенные эффекторного домена Fc, могут использоваться в качестве блокирующих агентов для рецепторов факторов роста и индукторов апоптоза [2]. Антитела и их производные также могут быть использованы как средства доставки к опухоли цитотоксических веществ (радиоизотопов, лекарственных препаратов, токсинов, цитокинов, других биологически активных белков) [2].

Рецептор эпидермального фактора роста человека 2 (HER2) сверхэкспрессируется в 20–30% случаев рака молочной железы и связан со снижением выживаемости пациентов [3]. С гиперэкспрессией HER2 связана распространенная аденокарцинома желудка или пищеводно-желудочного перехода и другие опухоли человека [4].

Гуманизированное моноклональное антитело трастузумаб Тz (торговая марка Герцептин), связывающееся с внеклеточным доменом HER2, было первым препаратом, одобренным для клинического применения при терапии HER2-гиперэкспрессирующих опухолей [3, 4]. Связываясь с HER2, Тz вызывает эндоцитоз и деградацию рецептора HER2 с последующим ингибированием сигнальных каскадов PI3K и MAPK, что, в конечном итоге, вызывает остановку клеточного цикла и апоптоз. Связывание Тz с HER2 может модулировать иммунную систему по механизму антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и ингибировать ангиогенез. Использование Tz как адъюванта в сочетании с химиотерапией или после нее повышает безрецидивную и общую выживаемость пациентов с ранней стадией рака молочной железы [3]. Однако серьезной клинической проблемой является наличие или возникновение резистентности к Tz, что требует дальнейших исследований возможностей комплексной терапии.

Интерферон бета-1 человека используется для лечения больных рецидивирующим рассеянным склерозом, оказывая противовоспалительное и иммуносупрессорное действие. Известно, что ИФН-бета обладает противовирусным, иммуномодулирующим и антипролиферативным действием [5]. Показана способность рекомбинантного ИФН-бета оказывать сильное антипролиферативное действие *in vitro* на клетки двух человеческих андроген-резистентных клеточных линий рака предстательной железы с нейроэндокринной дифференцировкой (DU-145, PC-3) [6], адренокортикальной карциномы (ACC линии H295 и SW13) [7], гастроэнтеропанкреатических нейроэндокринных опухолей [8], клеточных линий аденокарциномы поджелудочной железы человека (BxPC-3, MiaPaCa-2 и Panc-1) [9]. Подробное рассмотрение механизма действия интерферонов I типа (ИФН-альфа и ИФН-бета), а также современный взгляд на их применение в терапии рака представлены в обзоре [10].

Как Тz, так и ИФН-бета разрешены к клиническому применению на территории Российской Федерации [5, 11].

Представленные результаты являются частью работы по созданию иммуноцитокинового комплекса рекомбинантного биспецифического антитела и рекомбинантного человеческого ИФН-бета для лечения HER2-гиперэкспрессирующих опухолей, в первую очередь, рака молочной железы. Одна из составных частей биспецифического антитела должна связывать ИФН-бета и нейтрализовать его системное воздействие, вторая должна быть способна связываться с рецептором HER2 на поверхности опухолевых клеток. Предполагается, что эффективность ИФН-бета в составе иммуноцитокинового комплекса будет достигнута путем локального накопления ИФН-бета в местах локализации опухоли и метастатических узлов. Доставка ИФН-бета к клеткам опухоли при помощи нейтрализующего антитела позволила бы избежать связывания ИФН-бета со своими рецепторами вне опухоли, обеспечила высокие локальные концентрации ИФН-бета вблизи опухоли и не позволила произвести запуск нежелательных системных реакций, обуславливающих клиническую картину побочных эффектов, характерных для ИФН-бета как монопрепарата.

Целью данной работы было получение биспецифического антитела в формате Fab-scFv, связывающегося одновременно с HER2 и ИФН-бета, как компонента иммуноцитокинового комплекса с ИФН-бета — потенциального агента для лечения опухолей с гиперэкспрессией HER2. Для создания такого антитела были выбраны антитело Тz и полученное нами ранее нейтрализующее антитело B16 к ИФН-бета [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изначально на основе кодирующих последовательностей нейтрализующего ИФН-бета антитела В16 и антитела Тz нами были сконструированы последовательности, кодирующие биспецифические антитела в формате Fab-scFv, представляю-



Рис. 1. Схема экспрессионных кассет в pcDNA3.4 для образования Fab_{Tz} -scFv_{B16} (*a*) и Fab_{B16} -scFv_{Tz} (*b*). Как в 1*a*, так и в 1*b*-вариантах кассет расположение генов вариабельных доменов в последовательности, кодирующей scFv, может быть *VH-L3-VL* или *VL-L3-VH*, где *L3* – последовательность, кодирующая link3. Последовательности, кодирующие L-цепи Fab-фрагментов антител, клонированы по сайтам *NheI* и *XhoI* в отдельный вектор pcDNA3.4 Poly 40 (*b*). CMV – промотор цитомегаловируса; Tz – последовательности, кодирующие тяжелую цепь Fab-фрагмента трастузумаба (*a*) или scFv, соответствующий трастузумабу (*b*); B16 – последовательность, кодирующая scFv B16 (*a*) или тяжелую цепь Fab-фрагмента в B16 (*b*). *VH* и *VL* – гены вариабельных доменов антител; *CH1* – последовательность, кодирующая 1-й константный домен H-цепи антитела; *L1*, *L2*, *L3* – последовательности, кодирующие линкеры link1, link2, link3 соответственно; WPRE – последовательность регуляторного элемента; *TK*polyA – сигнальная последовательность регуляторного элемента; *NheI*, *Bam*HI, *XhoI*, – сайты узнавания рестриктаз; 6xHis – последовательность, кодирующая гексагистидиновый пептид.

щие собой объединение Fab-фрагмента антитела Тz и одноцепочечного варианта (scFv) антитела В16, в котором scFv к ИФН-бета присоединены к С-концу VH-CH1-фрагмента Н-цепи антитела Tz (Fab_{Tz}-scFv_{B16}) (рис. 1*a*). На 3'-конец последовательности, кодирующей scFv, была помещена последовательность, кодирующая гексагистидиновый пептид (6xHis), для выделения целевых белков с помошью аффинной хроматографии. Между VH-CH1кодирующим фрагментом и scFv-кодирующим фрагментом для обеспечения подвижности соединения цепей антитела были помещены последовательность link1, кодирующая EPSGP, и последовательность link2, кодирующая (GGGGS)₃. Для соединения последовательностей, кодирующих вариабельные домены в scFv, были использованы последовательности link3, кодирующие (GGGGS)₄ либо (GGGGS)₆. Последовательности линкеров были выбраны на основании литературных данных [13], которые, однако, не давали ответа на вопрос о предпочтительном порядке вариабельных доменов Н- и L-цепей в scFv, поэтому нами были спланированы различные варианты расположения цепей: VL-link3-VH (рис. 1a) и VH-link3-VL (схема не представлена). Объединение фрагментов, кодирующих VH и VL, с одновременным введением сайтов узнавания рестриктаз для последующего клонирования, созданием link3 и присоединением последовательности, кодирующей 6хHis, производили методом SOE-PCR.

В качестве вектора для обеспечения биосинтеза целевого белка в клетках эукариот была выбрана плазмида pcDNA3.4 Poly40 (собственная модификация вектора pcDNA3.4, Invitrogen со встроенным полилинкером). Ген легкой цепи Тz и последовательность, кодирующая (VH-CH1)_{Tz}link1-link2-scFv_{B16}-6xHis, с присоединенными к 5'-концу последовательностью Козак и последовательностями, кодирующими лидерные пептиды, были поставлены под контроль цитомегаловирусного промотора CMV. В экспрессионном векторе после генов находятся регуляторный элемент WPRE и сигнальная последовательность полиаденилирования мPHK тимидинкиназы вируса простого герпеса TKpA (рис. 1).

Для получения биспецифических рекомбинантных антител в формате Fab-scFv осуществляли трансфекцию клеток яичника китайского хомячка СНО парами экспрессионных векторов, один из которых обеспечивал синтез L-цепи антитела Tz, а другой — синтез VH-CH1-фрагмента H-цепи антитела Tz с присоединенным к нему scFv антитела к ИФН-бета.

ПАНИНА и др.



Рис. 2. Электрофореграмма образцов Fab_{Tz}—scFv(VH-4xG₄S-VL)_{B16} в 12% SDS-ПААГ. Дорожки *I*, 5 – образцы после выделения на носителе kappa-select, 2, 3 и 6, 7 – фракции после выделения на носителе kappa-select и очистки металлаффинной хроматографией, 4, 8 – проскок после металл-аффинной хроматографии. Дорожки 1-4 – в присутствии β -меркаптоэтанола, 5-8 – в отсутствие β -меркаптоэтанола. М – маркеры молекулярных масс (116, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4, 14.4 кДа).



Рис. 3. ВЭЖХ-хроматограммы Fab-scFv после выделения на аффинном носителе HiTrap KappaSelect: Fab_{Tz}-scFv_{B16} (a), Fab_{B16}-scFv_{Tz} (δ).

Выделение целевых белков проводили на колонке с носителем HiTrap KappaSelect, который обладает свойством преимущественного связывания L-цепи иммуноглобулинов. Оценку гомогенности и степени чистоты препарата проводили с использованием электрофоретического метода [14] и с помощью аналитической гель-фильтрации на носителе Superdex 200-10/300-GL. Было показано, что образцы Fab-scFv после выделения содержали примеси димера L-цепи антитела Tz (рис. 2, 3*a*). Наличие остатков гистидина в составе белка позволило применить дополнительную стадию очистки образцов с помощью металл-аффинной хроматографии с иммобилизованными на носителе ионами кобальта, что привело к удалению примеси димера L-цепи из препарата Fab-scFv (рис. 2).

Специфичность полученных Fab_{Tz}-scFv_{B16} была проанализирована с помощью непрямого иммуноферментного анализа на лизатах клеток различных опухолевых линий, как с гиперэкспрессией, так и с низкой экспрессией HER2. Клеточные лизаты – это смесь разнообразных белков, входящих в состав клетки. Среди них могут быть компоненты, склонные к неспецифическому связыванию с антителами, например, через углеводные части иммуноглобулинов. Неспецифичное связывание не всегда может быть убрано блокировкой, но его влияние на результаты анализа должно быть учтено. Для определения специфического связывания должны быть выбраны диапазоны концентраций антител, при которых неспецифическое связывание вносит несушественный вклал в результаты. С этой целью был поставлен иммуноферментный анализ на HER2-гиперэкспрессирующей и HER2-слабоэкспрессирующей клеточных линиях с использованием аптечного препарата Герцептин (положительный контроль). Эксперименты проводились как с блокировкой 1% BSA или 5% казеином, так и без блокировки. Было установлено, что при иммуноферментном анализе на



Рис. 4. Кривые титрования Fab_{Tz}-scFv_{B16} и контрольного антитела Герцептин (Tz) на лизатах HER2-гиперэкспрессирующей линии SKOV3 (*a*) и HER2-слабоэкспрессирующей линии SKOV3 (*б*).

клеточных лизатах подходящим диапазоном титрования антител является диапазон концентраций от 0 до 3 мкг/мл при обязательном контроле с использованием лизата HER2-негативной клеточной линии (данные не приведены). При проведении непрямого ИФА на лизатах клеток было показано, что Fab_{Tz}-scFv_{B16} достоверно связывают HER2 в составе клеточных лизатов HER2-гиперэкспрессирующей опухолевой линии (рис. 4*a*), при этом с лизатами HER2-слабоэкспрессирующей клеточной линии в диапазоне титрования антител до 1 мкг/мл связывания не происходит (рис. 4*б*).

При проведении непрямого ИФА с сорбцией ИФН-бета на твердую фазу с последующим нанесением Fab_{Tz} -scFv_{B16} было показано, что связывание с ИФН-бета таких молекул слабее по сравнению как с исходным мышиным моноклональным антителом, так и по сравнению с химерным полноразмерным антителом-прототипом B16 (данные не приведены).

Для того чтобы улучшить связывание Fab-scFv с ИФН-бета, было решено сконструировать FabscFv другого типа, в котором Fab-фрагмент образован VH-CH1-фрагментом и L-цепью антитела B16, а антитело Tz представлено в виде scFv-варианта (Fab_{B16}-scFv_{Tz}) (рис. 1 δ). Варианты расположения VH и VL в scFv антитела Tz, состав и длина линкеров, структура экспрессионных векторов для Fab_{B16}-scFv_{Tz} аналогичны конструкции Fab_{Tz}-scFv_{B16}.

Для получения новых биспецифических рекомбинантных Fab_{B16}-scFv_{Tz} так же, как и для Fab_{Tz}-scFv_{B16}, осуществляли трансфекцию клеток яичника китайского хомячка СНО парами плазмид, содержащими ген L-цепи антитела B16 и последовательность, кодирующую (VH-CH1)_{B16}-link1-link2-scFv_{Tz}-6xHis.

Выделение целевых белков, оценку гомогенности и степени чистоты препарата проводили, как и в случае Fab_{Tz} -scFv_{B16}. После проведения аналитической ВЭЖХ было обнаружено, что при экспрессии Fab_{B16} -scFv_{Tz} не наблюдаются примеси димера L-цепи антитела B16 (рис. 36), поэтому в дополнительной очистке методом металл-аффинной хроматографии не было необходимости.

Специфичность полученных Fab_{B16} -sc Fv_{Tz} также была проанализирована с помощью иммуноферментного анализа. Анализ проводился в двух вариантах: с сорбцией на твердой фазе рекомбинантного внеклеточного домена HER2 (рекHER2), полученного в нашей лаборатории (в печати) и с сорбцией ИФН-бета. Показано, что Fab_{B16} -sc Fv_{Tz} связывается как с рекHER2, так и с ИФН-бета (рис. 5).

При рассмотрении кривых титрования видно, что характер связывания Fab_{B16} -scFv_{Tz} с рекHER2 сходен с характером связывания полноразмерного биспецифического антитела (рис. 5*a*). Иммуноферментный анализ при титровании Fab-scFv на иммобилизованном препарате ИФН-бета показал способность Fab_{B16} -scFv_{Tz} связывать ИФНбета, сравнимую с полноразмерными биспецифическими антителами (рис. 5*б*). Эти данные косвенно свидетельствуют о биспецифическом характере связывания Fab_{B16} -scFv_{Tz} с антигенами.

Для подтверждения биспецифичности Fab_{B16} scFv_{Tz} был использован непрямой иммуноферментный анализ в "сэндвич"-модификации: а) с нанесением на подложку рекHER2, инкубированием с Fab-scFv, связыванием с биотинилированным ИФН-бета и детекцией после связывания с конъ-



Рис. 5. Кривые титрования Fab_{B16}-scFv_{Tz} в непрямом ИФА по сравнению с полноразмерным биспецифическим антителом: взаимодействие с рекHER2 (*a*), взаимодействие с ИФН-бета (δ). Fab scFv-LH6 — Fab_{B16}-scFv_{Tz}, в котором VL и VH в scFv разделены 6-ю повторами G₄S. CR MabB16химер. — полноразмерное биспецифическое антитело против HER2 и ИФН-бета.



Рис. 6. Кривые титрования Fab_{B16}-scFv_{Tz} в "сэндвич"-ИФА по сравнению с полноразмерным биспецифическим антителом. (*a*) Первичная сорбция рекНЕR2, (*б*) первичная сорбция ИФН-бета. В Fab_{B16}-scFv_{Tz} VL и VH разделены 6-ю повторами G₄S. CR MabB16химер. – полноразмерное биспецифическое антитело против HER2 и ИФН-бета.

югатом стрептавидин-пероксидаза хрена (рис. 6*a*); б) с нанесением на твердую фазу ИФН-бета, последующим инкубированием с Fab-scFv, связыванием после отмывки с биотинилированным рекHER2 и детекцией после инкубирования с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена (рис. 6*б*).

Результаты "сэндвич"-ИФА подтвердили биспецифический характер полученных образцов Fab_{B16}-scFv_{Tz}.

Влияние различных вариантов расположения VH и VL и длин линкеров в scFv-части биспецифического антитела в формате Fab-scFv на связывание с HER2 и ИФН-бета также было исследовано в непрямом "сэндвич"-ИФА при сорбции рекHER2 на твердую фазу, инкубации с антителами, последующей инкубации с биотин-ИФН-бета и, наконец, с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена (рис. 7). В качестве отрицательного контроля использовалось моноспецифичное антитело к HER2-рецептору (Герцептин).

По результатам анализа непрямым "сэндвич"-ИФА можно сказать, что лучшими вариантами Fab_{B16}-scFv_{Tz} являются те, в которых в scFv находятся следующие расположения вариабельных доменов Tz, соединенных линкером G_4S с 4-мя или 6-ю повторами G_4S : VH-4x G_4S -VL и VL-6x G_4S -VH.

Биологическую активность полученных образцов Fab_{B16}-scFv_{Tz} оценивали в опытах по нейтрализации антителами антипролиферативного дей-

ствия ИФН-бета. Эксперименты проводились на клеточных линиях с разным уровнем экспрессии HER2: линии аденокарциномы кишечника HT29 (не экспрессирующей HER2), линии аденокарциномы яичника человека SKOV3-HER2+ (с высокой экспрессией HER2) и линии SKOV3 (с низкой экспрессией HER2). К серийным разведениям биспецифических Fab-scFv. а также контрольных антител: мышиного антитела В16, нейтрализующего ИФН-бета, в качестве положительного контроля и биспецифического антитела, проявляющего анти-HER2 активность, но не нейтрализующего ИФНбета в качестве отрицательного контроля, добавляли рекомбинантный гликозилированный ИФНбета. Опухолевые клетки культивировали в смеси с МПК в присутствии ИФН-бета и антител в различных концентрациях. Культивирование проводили в течение 5 суток. Количество живых клеток оценивали в тесте MTT [15]. Нейтрализующую активность антител выражали в процентах от скорости пролиферации клеток без ИФН-бета и вычисляли по формуле:

% нейтрализации = $(A_i - A_0)/(A_{100} - A_0) \times 100\%$,

где A_i — среднее значение оптической плотности в лунках с *i*-той концентрацией антитела; A_0 среднее значение оптической плотности в лунках с ИФН-бета без антител; A_{100} — среднее значение оптической плотности в лунках без ИФН-бета и антител. Поскольку биспецифические антитела обладают собственной антипролиферативной активностью по отношению к HER2-позитивным клеткам за счет анти-HER2 активности, из значений нейтрализующей активности для Fab-scFv в комплексе с ИФН-бета вычитали соответствующие значения для отрицательного контроля. Кривые титрования приведены на рис. 8.

Было показано, что Fab_{B16} -scFv_{Tz}, в структурах scFv которых расположение вариабельных доменов и состав линкера VH-4xG₄S-VL или VL-6xG₄S-VH, демонстрируют способность нейтрализовать антипролиферативную активность ИФН-бета, сравнимую или превосходящую активность исходного мышиного антитела B16, послужившего прототипом Fab-фрагмента (рис. 8).

Результаты проведенных экспериментов показывают, что полученные рекомбинантные антитела в формате Fab-scFv демонстрируют специфичность к двум различным антигенам: ИФНбета человека и HER2-рецептору опухолевых линий. Показаны нейтрализующие свойства этих антител по отношению к ИФН-бета. Полученные характеристики антител позволяют использовать такие молекулы в качестве компонента иммуноцитокинового комплекса с ИФН-бета для изуче-



Рис. 7. Кривые титрования Fab_{B16} -scFv_{Tz} с различным расположением VH и VL и разными вариантами повторов G₄S (4 или 6) в scFv в непрямом "сэндвич"-ИФА при сорбции рекHER2 на твердую фазу. Линия Tz – титрование антитела Герцептин (отрицательный контроль).

ния терапевтической эффективности в отношении HER2-позитивных опухолей на животных моделях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы следующие реактивы и клеточные линии:

– питательные среды: DMEM (Gibco, США) и OptiCHO (Invitrogen, США), планшеты Nunc Maxisorp ELISA plates (Thermo Scientific, США),

– однокомпонентный субстрат 3,3',5,5'-Тетраметилбензидин (ТМВ) (НПО "БиоТест Системы", Россия), Тween-20 (РапReac, Испания), эндонуклеазы рестрикции, Т4 ДНК-лигаза (Thermo Scientific, США и "СибЭнзим", Россия), ДНКполимераза Tersus (Еvrogen, Россия), МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид), Pluronic F-68 (Invitrogen, США), Lipofectamine-3000 (Invitrogen, США),

 – олигонуклеотидные синтетические праймеры (Евроген, Россия):

TzHF6 (5')CGGCGGTGGAGGGTCGGAGGT-GCAGCTGGTGGAGTC(3'),

IgG-Link1 (5')CTGCTCAAGATGGGGGGGGGG GACGGCTTCTACGCCATGGACTACT(3'),

Link2F2 (5')CTCCTCGAGGGATCCCCCG-GGACCAGATGGTTCACAAGATTTGGGCTC-AACTC(3'),

Link2R2 (5')CCGGGGGGTGGCGGGGTCTGGT-GGTGGAGGCAGCGGTGGTGGGGG(3'),



Рис. 8. Результаты нейтрализации антипролиферативной активности ИФН-бета биспецифическими Fab_{B16}-scFv_{Tz}. (*a*) HT29 – клетки линии аденокарциномы кишечника (не экспрессирующей HER2), (*б*) SKOV3 HER2+ – клетки линии аденокарциномы яичника человека (с гиперэкспрессией HER2), (*в*) SKOV3 – клетки с низкой экспрессией HER2. Fab scFv-LH6 – Fab_{B16}-scFv_{Tz}, в котором VL и VH в scFv разделены 6-ю повторами G₄S. CR MabB16химер. – полноразмерное биспецифическое антитело против HER2 и ИФН-бета. Fab scFv-HL4 – Fab_{B16}-scFv_{Tz}, в котором VL и VL в scFv разделены 4-мя повторами G₄S. CR MabB16химер. – полноразмерное биспецифическое антитело против HER2 и ИФН-бета.

Link2R3 (5')GATCCCCCACCACCGCTGCCTC-CACCACCAGACCCGCCACC(3'),

Link2F3 (5')CACCGCCAGAGCCACCTCCG-CCTGAACCTCCGCCTCCAGACCCTCCGCC-ACC(3'),

 препарат интерферона-бета: фармацевтическая субстанция гликозилированного ИФН-бета производства ООО "Фармапарк",

 – клетки яичника китайского хомячка СНО (Invitrogen, США),

– опухолевые клеточные линии: аденокарцинома яичника человека SKOV3-HER2 (ATCC® HTB-77™), аденокарцинома толстой кишки человека HT29 (ATCC® HTB-38™); аденокарцинома яичника человека SKOV3, утратившая гиперэкспрессию HER2.

Конструирование VH-CH1-фрагмента антитела трастузумаб. Последовательность, кодирующую Нцепь антитела Tz, укорачивали, оставляя последовательность, кодирующую СН1-домен. Работу проводили в два этапа. На первом этапе на матрице гена TzH с помощью ПЦР с праймерами TzHF6 и IgG-link1, получали фрагмент, кодирующий CH1домен IgG1 с присоединенной к С-концу последовательностью, кодирующую EPSGP (link1), одновременно внося на 3'-конец фрагмента сайты узнавания рестриктаз XmaI, BamHI и XhoI для последующих клонирований. Выделенный после электрофоретического разделения продуктов ПЦР в 1% агарозном геле фрагмент присоединяли к последовательности, кодирующей VH_т по сайту узнавания рестриктазы Bsp1201. Полученную плазмиду обозначили как pcDNA3.4-TzVH-CH1-link1. На втором этапе к фрагменту, кодирующему VH-

СН1-антитела Тz и EPSGP (link1), присоединяли последовательность link2, кодирующую (GG-GGS)₃. Для этого с помощью отжига фосфорилированных олигонуклеотидных праймеров Link2F2 и Link2R2 получали олигонуклеотидный дуплекс с "липкими" концами *XmaI* и *Bam*HI, который клонировали в плазмиду pcDNA3.4-TzVH-CH1link1, предобработанную рестриктазами *XmaI* и *Bam*HI, получив плазмиду pcDNA3.4-TzVH-CH1link1-link2.

Конструирование scFv. Конструкции одноцепочечных вариантов антител к ИФН-бета получали с помощью ПЦР в несколько стадий. Для конструирования были составлены олигонуклеотидные праймеры, как специфичные к генам вариабельных доменов H- и L-цепей антител, так и универсальные для последовательностей константных доменов обоих антител.

На первой стадии получали фрагменты, содержащие кодирующие последовательности VH- и VL-доменов B16, с помощью ПЦР со специфическими прямыми праймерами и универсальными обратными праймерами для CH1-доменов IgG и каппа-константного домена. Продукты реакции разделяли в 1% агарозном геле. Фрагменты выделяли из геля и использовали для второй стадии ПЦР с универсальными перекрывающимися олигонуклеотидными праймерами Link2F3 и Link2R3, вносящими на 3'-конец фрагментов, кодирующих вариабельные домены, и 5'-конец фрагментов, кодирующих константные домены антител, участки, кодирующие link3. Продукты реакции разделяли в 1% агарозном геле, фрагменты нужной длины выделяли из геля и использовали для третьей стадии ПЦР (SOE-PCR) с концевыми праймерами, которые вносили сайты рестрикции BamHI и XhoI, а также последовательности, кодирующие 6xHis, на 3'-концы фрагментов перед сайтом XhoI. Продукты реакции клонировали в вектор pAL-TA (Евроген) и секвенировали.

Для получения последовательности, кодирующей scFv антитела Tz, использовали ту же схему получения и клонирования фрагментов.

Конструирование VH-CH1-фрагмента B16. Последовательность, кодирующую H-цепь антитела B16 к ИФН-бета, укорачивали, заменяя кодирующую последовательность константных доменов фрагментом, полученным после рестрикции плазмиды pcDNA3.4-Tz VH-CH1-link1-link2 по сайтам узнавания рестриктаз *Bsp*120I и *Xho*I и содержащим кодирующую последовательность первого константного домена IgG1 и линкеров link1 (EPSGP) и link2 (GGGGS)₃.

Получение экспрессионных векторов для FabscFv. Фрагменты, кодирующие scFv B16, клонировали по сайтам узнавания рестриктаз *Bam*HI и *Xho*I в вектор pcDNA3.4-Tz VH-CH1-link1-link2. Аналогично, фрагменты, кодирующие scFv Tz, клонировали по сайтам узнавания рестриктаз *Bam*HI и *Xho*I в вектор pcDNA3.4-B16 Tz VH-CH1-link1link2. Фрагменты, кодирующие L-цепи антител, клонировали по сайтам *Nhe*I и *Xho*I в вектор pcDNA3.4-Poly40.

Транзиентная экспрессия Fab-scFv в клетках СНО. Клетки яичника китайского хомячка СНО были использованы для секретируемой экспрессии рекомбинантных Fab-scFv. Для этого клетки культивировали в колбах Эрленмейера в CO₂-инкубаторе при 37°C, 95% влажности и 8% CO₂ в станлартной бессывороточной среле CD OptiCHO с добавлением 200 мМ L-глутамина до конечной концентрации 8 мМ и 0.18% (v/v) Pluronic F-68 до концентрации 4 × 10⁶ клеток/мл за 24 ч до трансфекции. Во флаконы Эрленмейера объемом 125 мл засевали 30 мл клеточной суспензии (4 × × 10⁶ клеток) при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере с частотой 130 об./мин и через 20-24 ч проводили трансфекцию с использованием трансфецирующего pearentra Lipofectamine-3000 согласно стандартному протоколу производителя [16]. Плазмидную ДНК добавляли к клеткам в виде ДНК-липосомного преципитата. Культуральный флакон инкубировали при температуре 37°С, 95% влажности, в атмосфере 8% СО₂ и непрерывном перемешивании 130 об./мин. Измерение концентрации клеток и их жизнеспособности проводили с использованием 0.4% раствора трипанового синего в камере Горяева. После 7-9 дней инкубации культуры осветляли центрифугированием при 1200 об./мин в течение 10 мин. Супернатант дополнительно центрифугировали при 4000 об./мин в течение 15 мин.

Выделение и очистка Fab-scFv. Выделение целевых белков проводили на колонке с носителем HiTrap KappaSelect (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) объемом 5 мл. К культуральной жидкости добавляли 10% объема 10-кратного Tris-HCl буфера (200 мМ Tris-HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.2) и наносили на предварительно уравновешенную колонку при скорости потока 2-3 мл/мин при давлении не более 0.5 МПа. Колонку промывали буфером Tris-HCl объемом, равным 5 объемам колонки. Элюцию осуществляли буфером 0.1 М глицин, рН 3.0. Элюированный раствор нейтрализовали, добавляя 0.1 объема буфера для нейтрализации (1 M Tris, pH 8.0). Полученный раствор белка диализовали против фосфатного буфера (0.01 M Na₂HPO₄, 0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, рН 7.2) и стерилизовали через мембранные фильтры 0.22 мкм. Оценку гомогенности и степени

чистоты препарата проводили с использованием электрофоретического метода [14]. Дополнительно образцы охарактеризовывали с помощью аналитической гель-фильтрации на носителе Superdex 200-10/300-GL объемом 1 мл. Концентрацию целевых белков определяли спектрофотометрически с использованием NanoPhotometer P300 (IMPLEN, Germany). Дополнительную очистку препаратов Fab-scFv при необходимости проводили на Chelating Sepharose[™] Fast Flow (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) с иммобилизованными ионами кобальта согласно рекомендациям производителя.

Непрямой ИФА. Непрямой ИФА использовали для определения способности полученных белков взаимодействовать с ИФН-бета или рекомбинантным внеклеточным доменом HER2. Антигены в буфере PBS (0.5 мкг/мл) сорбировали на планшет, блокировали 5% раствором BSA в PBS и промывали. Затем добавляли исследуемые белки, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, промывали раствором 0.05% Tween 20 в PBS. После промывки добавляли конъюгат моноклонального антитела 4G7 против каппа домена легкой цепи Ig человека (ООО "Биалекса", Россия) с пероксидазой хрена в разведении 1 : 75000, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, промывали раствором 0.05% Tween 20 в PBS и добавляли проявляющий субстрат тетраметилбензидин. После развития окраски реакцию останавливали добавлением 10% серной кислоты. Измеряли оптическое поглощение при 450 нм.

Непрямой ИФА с использованием клеточных лизатов. ИФА проводили на лизатах клеток различных опухолевых линий, как экспрессирующих, так и не экспрессирующих HER2. Для приготовления лизатов культуральные флаконы или чашки Петри помещали на лед, промывали один раз холодным PBS, затем снимали клетки при помощи культурального скребка. Клеточный осадок дважды промывали холодным PBS, центрифугируя со скоростью 2000 об./мин при 4°С в течение 10 мин. Затем клеточный осадок лизировали буфером RIPA с добавлением ингибиторов протеаз 1 мМ PMSF и 1 мМ апротинина. Состав буфера RIPA: 20 MM Tris-HCl (pH 7.5), 150 MM NaCl, 1 MM Na₂EDTA, 1 мМ EGTA, 1% NP-40, 1% дезоксихолат натрия, 2.5 мМ пирофосфат натрия, 1 мМ b-глицерофосфат, 1 мМ Na₃VO₄, 1 мкг/мл леупептина. Осадок обрабатывали ультразвуком для наиболее полной экстракции мембранных белков, затем центрифугировали в течение 10 мин при 12000 об./мин и температуре 4°С. Супернатанты отбирали, измеряли в них концентрацию белка, аликвоты супернатантов хранили при -20°С. Для проведения ИФА использовали процедуру, описанную выше, с некоторыми вариациями. Клеточные лизаты сорбировали на планшет в концентрации 10 мкг/мл в PBS (0.01 M KH_2PO_4 , 0.1 M NaCl), pH 7.2–7.4 по 50 мкл в лунки 96-луночного планшета для ИФА в течение ночи при 4°С. Планшет трижды отмывали PBS—Т (0.1% Твин 20) по 200 мкл в лунку. Образцы биспецифических антител титровали от 3000 нг/мл с шагом 3 в PBS— AT (0.01 M KH_2PO_4 , 0.1 M NaCl, 0.2% BSA, 0.1% Твин 20). Планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Отмывки, реакцию с конъюгатом, проявление и измерение оптического поглощения проводили, как описано выше.

В качестве положительного контроля использовали антитело трастузумаб (Герцептин) в концентрации 10 мкг/мл.

Определение одновременного связывания интерферона-бета и рецептора HER2 методом "сэндвич"-ИФА. Подтверждение биспецифического характера связывания полученного антитела проводили с помощью "сэндвич"-ИФА в двух вариантах. В 1-ом варианте на твердую фазу сорбировали ИФН-бета (1 мкг/мл) в количестве 100 мкл/лунку, затем после блокировки инкубировали с Fab-scFv (1 мкг/мл) в серийных разведениях, кратным 3. После отмывки несвязавшихся антител добавляли биотинилированный рекомбинантный HER2 (200 нг/мл) и конъюгат авидин-пероксидаза хрена (150 нг/мл). Во 2-ом варианте на твердую фазу сорбировали рекомбинантный внеклеточный домен HER2 (200 нг/мл), затем Fab-scFv также в серийных разведениях, биотинилированный ИФНбета (250 нг/мл) и конъюгат авидин-пероксидаза хрена (150 нг/мл). В качестве контроля использовали моноспецифичное антитело против HER2рецептора (Герцептин) и полученное нами рекомбинантное, биспецифичное к HER2-рецептору и ИФН-бета, полноразмерное антитело.

Определение нейтрализующей активности FabscFv. Для анализа использовали опухолевые клетки человека 3-х линий: аденокарцинома кишки HT29, не экспрессирующая HER2; аденокарцинома яичника человека SKOV3 с низкой экспрессией HER2; аденокарцинома яичника человека SKOV3-HER2+ с высокой экспрессией HER2. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МПК) выделяли из цельной крови здорового донора в градиенте фиколла-1077 по методике [17].

Готовили серийные разведения антител биспецифических Fab-scFv, а также контрольных антител: мышиного антитела B16, нейтрализующего ИФН-бета, в качестве положительного контроля и биспецифического антитела, обладающего анти-HER2 активностью, но не нейтрализующего ИФНбета, в качестве отрицательного контроля (–Кон-
троль). К антителам добавляли рекомбинантный гликозилированный ИФН-бета производства ООО "Фармапарк" в концентрации 3 нг/мл. Все растворы готовили в полной ростовой среде с 2% телячьей сывороткой.

Опухолевые клетки культивировали в смеси с МПК в присутствии ИФН-бета и антител в различных концентрациях. Конечные концентрации активных веществ и клеток составили следующие значения: антитела – от 0 до 100 мкг/мл; ИФНб – 1 нг/мл (0 в контрольных лунках); МПК – 50 тыс. клеток/лунку; опухоли: 3 тыс. клеток/лунку. Культивирование проводили в течение 5 суток. Количество живых клеток оценивали в тесте МТТ [15]. Каждое измерение проводили в 4 повторах, находили среднее значение. Нейтрализующую активность антител выражали в процентах от скорости пролиферации клеток без ИФН-бета и вычисляли по формуле:

% нейтрализации = $(A_i - A_0)/(A_{100} - A_0) \times 100\%$,

где A_i – среднее значение оптической плотности в лунках с *i*-той концентрацией антитела; A_0 – среднее значение оптической плотности в лунках с ИФН-бета без антител; A_{100} – среднее значение оптической плотности в лунках без ИФН-бета и антител. Поскольку биспецифические антитела обладают собственной антипролиферативной активностью по отношению к HER2-позитивным клеткам за счет анти-HER2 активности (Tz), из значений нейтрализующей активности для FabscFv в комплексе с ИФН-бета вычитали соответствующие значения для контрольного антитела (–Контроль).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе нейтрализующего антитела В16 к ИФН-бета и антитела трастузумаб (Tz), специфичного к HER2-рецептору, нами получены различные варианты биспецифических антител в формате Fab-scFv. Показано, что полученные белки связывают и нейтрализуют ИФН-бета, также они связывают HER2-рецептор в лизатах опухолевых клеток и в виде рекомбинантного внеклеточного домена. Такие молекулы могут быть использованы в качестве компонента иммуноцитокинового комплекса с ИФН-бета для доставки ИФН-бета к клеткам HER2-позитивных опухолей, что позволило бы избежать проявления побочных эффектов при введении ИФН-бета в виде монопрепарата. Планируется проверить такой подход к терапии HER2-позитивных опухолей на моделях животных.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение о суб-

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 4 2020

сидии № 075-15-2019-1385 от 19.06.2019, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0189).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sharkey R.M., Goldenberg D.M. // CA Cancer J. Clin. 2006. V. 56. P. 226–243.
- Schoonooghe S., Kaigorodov V., Zawisza M., Dumolyn C., Haustraete J., Grooten J., Mertens N. // BMC Biotechnol. 2009. V. 9. P. 70.
- Nahta R., Esteva F. // Oncogene. 2007. V. 26. P. 3637– 3643.
- 4. https://www.roche.ru/ru/produkty/katalog/gerceptin. html.
- 5. Регистр лекарственных средств России. https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2711.htm.
- Dicitore A., Grassi E.S., Borghi M.O., Gelmini G., Cantone M.C., Gaudenzi G., Persani L., Caraglia M., Vitale G. // J. Endocrinol. Invest. 2017. V. 40. P. 761–770.
- van Koetsveld P.M., Vitale G., de Herder W.W., Feelders R.A., van der Wansem K., Waaijers M., van Eijck C.H., Speel E.J., Croze E., van der Lely A.J., Lamberts S.W., Hofland L.J. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2006. V. 91. P. 4537–4543.
- Vitale G., de Herder W.W., van Koetsveld P.M., Waaijers M., Schoordijk W., Croze E., Colao A., Lamberts S.W., Hofland L.J. // Cancer Res. 2006. V. 66. P. 554–562.
- Vitale G., van Eijck C.H., van Koetsveld Ing P.M., Erdmann J.I., Speel E.J., van der Wansem Ing K., Mooij D.M., Colao A., Lombardi G., Croze E., Lamberts S.W., Hofland L.J. // Ann. Surg. 2007. V. 246. P. 259–268.
- 10. Borden E.C. // Nat. Rev. Drug Discov. 2019. V. 18. P. 219–234.
- Регистр лекарственных средств России. https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_87759.htm.
- Алиев Т.К., Долгих Д.А., Кирпичников М.П., Панина А.А., Рыбченко В.С., Свешников П.Г., Солопова О.Н., Топорова В.А., Шемчукова О.Б. Заявка на патент № 2018147193 от 28.12.2018.
- Brinkmann U., Kontermann R.E. // MAbs. 2017. V. 9. P. 182–212.
- 14. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680-685.
- 15. *Mosmann T.* // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. P. 55–63.
- https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ lipofectamine3000_protocol.pdf.
- Panda S.K., Ravindran B. // Bio-protocol. 2013. V. 3(3). P. 323.

The Development of the Bispecific Antibody in Fab-scFv-Format Based on an Antibody to Human Interferon Beta-1 and Antibody to HER2 Receptor

A. A. Panina^{*, #}, V. A. Toporova^{*}, V. S. Rybchenko^{**},

D. S. Balabashin*, V. V. Argentova**, S. A. Yakimov*, O. N. Solopova***, ****,

T. K. Aliev**, D. A. Dolgikh*, P. G. Sveshnikov***, and M. P. Kirpichnikov*, **

[#]*Phone:* +7 (916) 292-76-51; e-mail: paniann07@yandex.ru

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,

ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, str. 12, Moscow, 119991 Russia

***Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy, Simferopolsky bulv. 8, Moscow, 117638 Russia

**** Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology"

of the Ministry of Health of the Russian Federation (N.N. Blokhin NMRCO), Kashirskoe shosse 23, Moscow, 115478 Russia

The development of new therapies for malignant tumors is an urgent task. Currently, the humanized antibody trastuzumab is considered the "gold standard" in the complex treatment of breast tumors with overexpression of HER2, human epidermal growth factor receptor 2. However, in some cases, resistance to the specified drug is observed. The search for new therapies for HER2-associated tumors seems to be an important area of research. A number of clinical studies are currently underway on the use of human interferon-beta (IFN-beta) in oncology. Most of these studies use viral vectors carrying the interferon-beta gene to reduce the systemic effect of this cytokine. The immunocytokine complex of the bispecific antibody and IFN-beta developed by us also contains a mechanism for avoiding the systemic action of IFN-beta. Part of the development of such a complex is the creation of bispecific antibody specific for the HER2 receptor, we obtained various variants of bispecific antibodies in Fab-scFv format. It was shown that the obtained proteins bind and neutralize IFN-beta, and they also bind the HER2 receptor in tumor cell lysates and as a recombinant extracellular domain. Such molecules in the immunocytokine complex can be used as delivery vehicles of IFN-beta to HER2-positive tumor cells.

Keywords: IFN-beta, CHO, Trastuzumab, Fab-scFv, HER2



СИНТЕЗ НОВЫХ БИ-ГЕТЕРОЦИКЛОВ КАК ЦЕННЫХ АНТИДИАБЕТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ: 2-({5-((2-АМИНО-1,3-ТИАЗОЛ-4-ИЛ)МЕТИЛ)-1,3,4-ОКСАДИАЗОЛ-2-ИЛ} СУЛЬФАНИЛ)-*N*-(ЗАМЕЩЕННЫЙ) АЦЕТАМИДЫ¹

© 2020 Muhammad Athar Abbasi^{*,#}, Muhammad Shahid Ramzan^{*}, Aziz-ur-Rehman^{*}, Sabahat Zahra Siddiqui^{*}, Syed Adnan Ali Shah^{**}, Muhammad Arif Lodhi^{***}, Farman Ali Khan^{***}, and Bushra Mirza^{****}

* Department of Chemistry, Government College University, Lahore-54000 Pakistan

** Faculty of Pharmacy and Atta-ur-Rahman Institute for Natural Products Discovery (AuRIns), Level 9, FF3, Universiti Teknologi MARA, Puncak Alam Campus, 42300 Bandar Puncak Alam, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

*** Department of Biochemistry, Abdul Wali Khan University, Mardan-23200 Pakistan

**** Department of Biochemistry, Quaid-i-Azam University, Islamabad, 45320 Pakistan

Поступила в редакцию 02.12.2019 г. После доработки 13.01.2020 г. Принята к публикации 16.01.2020 г.

Синтез новой серии *S*-замещенных ацетамидных производных 5-[(2-амино-1,3-тиазол-4-ил)метил]-1,3,4-оксадиазол-2-тиола был синтезирован и оценен для изучения ингибирования ферментов наряду с цитотоксическим поведением. Этил-2-(2-амино-1,3-тиазол-4-ил)ацетат превращали в соответствующий гидразид кислоты с помощью гидразингидрата в этаноле. Рефлюкс кислого гидразида с дисульфидом углерода приводил к 5-[(2-амино-1,3-тиазол-4-ил)метилу]-1,3,4-оксадиазол-2-тиолу. Различные электрофилы были синтезированы реакцией соответствующих анилинов (по одному в каждой реакции) и 2-бромактилбромида в водной среде. Целевые бигетероциклические соединения были синтезированы путем перемешивания нуклеофильного 5-[(2-амино-1,3-тиазол-4-ил)метил]-1,3,4-оксадиазол-2-тиола с различными электрофильными ацетамидами (один после другого), в ДМФА с использованием LiH в качестве основания и активатора. Предложенные структуры вновь синтезированных соединений были получены с помощью спектроскопических методов, таких как ¹Н ЯМР, ¹³С ЯМР, ЭИ МС и элементный анализ. Эти новые би-гетероциклы были протестированы на их антидиабетический потенциал посредством ингибирования *in vitro* фермента α-глюкозидазы. Исследование in vitro этих молекул также соответствовало данным их ингибирования ферментов. Кроме того, эти молекулы были проанализированы на предмет их цитотоксического поведения против солевых креветок. Из результатов следует, что большинство из них проявляют очень мощный ингибирующий потенциал в отношении изученного фермента и могут быть использованы в качестве ценного антидиабетического агента.

Ключевые слова: этил 2-(2-амино-1,3-тиазол-4-ил)ацетат, 1,3,4-оксадиазол, ацетамид, ингибирование фермента, молекулярный докинг, цитотоксичность

DOI: 10.31857/S013234232004003X

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

[#] Автор для связи: (тел.: (+92)-42-111000010; эл. почта: atrabbasi@yahoo.com; abbasi@gcu.edu.pk (Prof. Dr. Muhammad Athar Abbasi)).



З-АРИЛ(ГЕТЕРИЛ)-5-ФЕНИЛИНДЕНО[1,2-*d*]ТИАЗОЛО[3,2*a*]ПИРИМИДИН-6(5*H*)-ОНЫ: СИНТЕЗ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ¹

© 2020 G. Rajitha*, C. G. Arya**, B. Janardhan**,[#], S. V. Laxmi***, G. Ramesh****, and U. Sujana Kumari*

*Department of Chemistry, Gayatri Vidya Parishad College of Engineering (A), Andhra Pradesh, 530048 India **Department of Chemistry, National Institute of Technology Calicut, Kerala, 673601 India ***Department of Chemistry, Palamuru University, Mahabubnagar, Telangana State, 509001 India ****Department of Chemistry, National Institute of Technology Warangal, Telangana State, 506004 India Поступила в редакцию 29.07.2019 г. После доработки 13.09.2019 г. Принята к публикации 29.10.2019 г.

Разработка новых противомикробных агентов является неотъемлемой частью борьбы с инфекционными заболеваниями, вызываемыми устойчивыми к антибиотикам микробами. Мы синтезировали серию новых 3-замещенных 5-фенилинденотиазолопиримидинонов с помощью классических методов. Все молекулы были исследованы *in vitro* на предмет их противомикробной активности по отношению к различным штаммам бактерий и грибов. Результаты сравнивали со значениями, полученными для стандартных антибактериального (стрептомицин) и противогрибкового (клотримазол) препаратов. Из двенадцати синтезированных аналогов 4-метоксифенил-5-фенилиндено[1,2-*d*]тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-6(5*H*)-он показал активность, сравнимую с таковой контрольных препаратов против бактериального штамма *Staphylococcus aureus* (минимальная ингибирующая концентрация 25 мкг/мл, зона ингибирования 22 мм) и грибка *Aspergillus niger* (зона ингибирования 20 мм). Остальные тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-6(5*H*)-оны показали слабую и умеренную активность по отношению к исследованным бактериальным и грибковым штаммам.

Ключевые слова: антимикробная активность, 3-(бромоацетил)кумарин, 1,3-индандион, фенацил бромид, тиазолопиримидинон

DOI: 10.31857/S0132342320040120

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

[#] Автор для связи: (тел.: +0091-0891-2535788; эл. почта: rajitha.jyothi3@gmail.com).